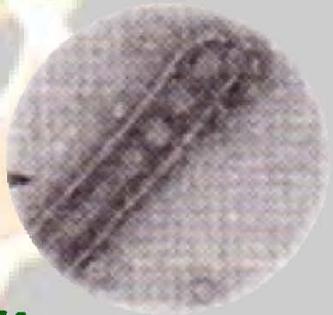
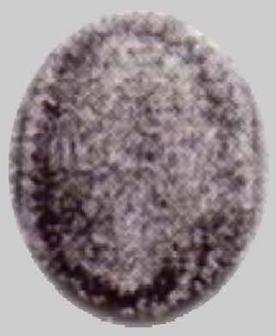




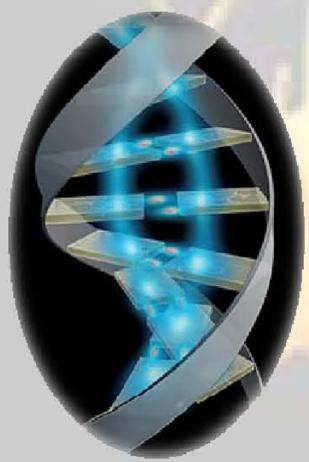
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"  
Departamento de Parasitología



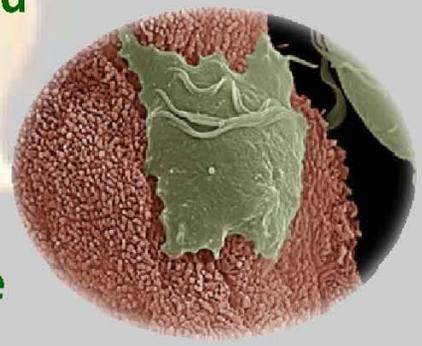
**Virus de *Trichomonas vaginalis*:  
análisis filogenético y de la  
posible asociación con la  
virulencia del parásito**



Tesis presentada en opción al grado científico  
de Doctor en Ciencias de la Salud



**Autor: Lic. Jorge Fraga Nodarse**



La Habana, 2012

**Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"  
Departamento de Parasitología**

**Virus de *Trichomonas vaginalis*: análisis  
filogenético y de la posible asociación con la  
virulencia del parásito**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. Jorge Fraga Nodarse  
Tutor: Dra. Lázara Rojas Rivero, Dr.C**

**La Habana, 2012**

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADN polimerasa</b>	Enzimas que intervienen en la replicación del ADN
<b>ADNasa</b>	Enzima que cataliza la rotura de los enlaces fosfodiéster
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AFLP</b>	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados
<b>AP23</b>	Proteína de adhesión 23 kDa
<b>AP33</b>	Proteína de adhesión 33 kDa
<b>AP51</b>	Proteína de adhesión 51 kDa
<b>AP65</b>	Proteína de adhesión 65 kDa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasas. Enzimas que catalizan la hidrólisis del ARN
<b>ATCC</b>	Colección Americana de Cultivos Tipos
<b>Blastn</b>	Programa informático de alineamiento de secuencias nucleótidas
<b>Blastp</b>	Programa informático de alineamiento de secuencias aminoacídicas
<b>bootstrap</b>	Método estadístico de re muestreo. Término utilizado para referir el soporte de los grupos monofiléticos
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2-deoxiuridina
<b>C</b>	Citosina
<b>CDC</b>	Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, EUA
<b>CDF</b>	Factor de desprendimiento celular
<b>CEV</b>	Células epiteliales vaginales
<b>CLM</b>	Concentración Letal Mínima
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CP</b>	Proteína de la cápside
<b>CsCl</b>	Cloruro de cesio
<b>dNTPs</b>	Mezcla de nucleótidos trifosfato
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>ARNdc</b>	Virus ARN doble cadena
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida
<b>EST</b>	Marcador de secuencia expresada

<b>G</b>	Guanina
<b>GenBank</b>	Banco de Genes
<b>GP63</b>	Glicoproteína de 63kDa
<b>hsp70</b>	Proteína de choque térmico 70 kDa
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IPK</b>	Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido
<b>ITS</b>	Infecciones de Transmisión Sexual
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LB</b>	Medio de Luria Bertani
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>MEGA</b>	Programa Bioinformático
<b>MLST</b>	Tipificación por secuencias de multilocus
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica, EUA
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OR</b>	Razón de productos cruzados
<b>ORF</b>	Marcos abiertos de lectura
<b>OTU</b>	Unidades taxonómicas operativas
<b>P230</b>	Proteína de 230 kDa
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguadora
<b>PFOX</b>	Piruvato ferredoxina oxidoreductasa
<b>P270</b>	Proteína inmunogénica de 270 kDa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pI</b>	Punto isoelectrico
<b>RAPD</b>	ADN polimórfico amplificado al azar
<b>RACE</b>	Amplificación Rápida de los Extremos de ADNc
<b>RCP</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RdRp</b>	ARN Polimerasa Dependiente de ARN
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción
<b>Ribosomal frameshifting</b>	Corrida del marco de lectura
<b>RT-RCP</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa
<b>SDS</b>	Duodecilsulfato sódico
<b>SSC</b>	Solución amortiguadora: acetato de sodio 0,3 M; citrato de sodio 0,03M pH=7,4
<b>T</b>	Timina
<b>TBE</b>	Solución amortiguadora Tris-borato EDTA
<b>TE</b>	Solución amortiguadora Tris-EDTA

<b>TLCK</b>	Na-p-tosil-lisina clorometilcetona HCl
<b>TNM</b>	Solución amortiguadora: NaCl 150 mM; MgCl <sub>2</sub> 5mM; Tris -HCl 50mM; pH 7,5
<b>Tris base</b>	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
<b>UPGMA</b>	Método agrupamiento Análisis no pareado de media aritmética
<b>Valor E</b>	Es conocido como e-valor ( <u>e-value</u> ) de corte, y nos permite definir qué alineamientos queremos obtener de acuerdo a su significación estadística.
<b>Valor P</b>	La probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido, suponiendo que la hipótesis nula es cierta.
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VTVs</b>	Virus de <i>Trichomonas vaginalis</i>
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Lázara Rojas Rivero, mi gratitud y respeto, por su guía, apoyo y preocupación constante.

A Idalia por transmitirme el amor para el estudio de las *trichomonas*, así como por ser mi compañera de laboratorio día a día en el estudio de este parásito, gracias por sus acertados comentarios y nuevas ideas aportadas durante la revisión de este trabajo.

A la Dra. Hilda Hernández por su entrega en la revisión de este documento.

A la Dra. Ana Margarita Montalvo, por haberme dado la posibilidad de trabajar a su lado en el Proyecto de Colaboración con investigadores del Laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica, pues esta interacción contribuyó significativamente a mi formación en el campo de la Parasitología Molecular y de forma indirecta la realización de la parte experimental del trabajo que hoy defendemos. Gracias también por la crítica revisión de este documento y por estimularme a dar este paso en la vida profesional.

Al Dr. Fidel A. Núñez por su ayuda incondicional en el análisis estadístico del trabajo, así como por la crítica revisión de este documento.

A Yenisey, mi alumna, colega de laboratorio y amiga.

A todos los miembros de la Comisión Científica Especializada de Parasitología en especial al Dr. Luis Fonte por la revisión realizada a este documento y sus acertados comentarios.

A mis compañeros del Departamento de Parasitología y de la Vicedirección de Parasitología, por su ayuda y preocupación.

A la Dra. Carmen Fernández, Lic. Nadia Rodríguez y Lic. Brian Mondeja por su ayuda incondicional en el trabajo relacionado con *Mycoplasma hominis*.

A la Dra. Rosmary Rodríguez, por su disposición incondicional a revisar este documento y por ayudarme a comprender mejor a los virus.

A Maribel, por su paciencia y apoyo en todo el proceso de mi aspirantura.

A la Dra. Mayra Muné por la revisión crítica de este documento y por ser una oponente especial.

A la Dra. Isel Pascual por su oponencia, sus comentarios y criticas sin dudas me ayudaron a llegar a la etapa final.

A mis compañeros de la Dirección: Maité, Gloria, Juanita, Pele, Pana, La China con los que he compartido estos últimos años de trabajo, gracias por su cariño, consideración y apoyo incondicional.

A Alicia, gracias por tu amistad y apoyo siempre.

A María Eugenia, Bali, Dulce e Idalmis, que tanto me ayudaron en la logística del documento.

Al Prof. Gustavo Kourí, por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado, trasmitirme el amor por la investigación y estimularme a concluir el doctorado.

A mi familia: Yoel y Yudis, por ser mis amigos y hermanos, mi esposa por sus acertadas recomendaciones, por ser mi más crítica revisora y por ser tan especial, sin ella no hubiera logrado decidirme y llegar al final, mis hijas que son mi mayor felicidad, mis padres a quienes les debo todo lo que soy hoy, en especial, a mi madre que hoy no me acompaña en esta etapa de mi vida y que en donde quiera que esté le dedico este documento y lo que ello implica, su ejemplo y dedicación a la ciencia y al trabajo constituyeron elementos importantes en mi formación como persona y como investigador.

A todos aquellos que en mayor o menor medida han puesto su cuota de esfuerzo para hacer posible esta Tesis de Doctorado.

**Mis más profundos agradecimientos a todos.**

# ***DEDICATORIA***

*A mi madre, por su guía y amor*

## SINTESES

*Trichomonas vaginalis* puede encontrarse infectado con virus ARN de doble cadena denominados Virus de *Trichomonas vaginalis* (VTVs). Los VTVs se han relacionado con la expresión de algunos factores de virulencia del parásito. En el presente estudio se demostró por primera vez la presencia de VTVs en aislamientos cubanos de *T. vaginalis*, y se detectó la presencia de las especies 1 y 2. El estudio filogenético que se realizó apoya la monofilia de los VTVs, así como su nomenclatura taxonómica en un género aparte, *Trichomonasvirus* y no como un subgénero dentro de *Giardiavirus*. Cuatro variantes genéticas (VTV 1-4) bien soportadas estadísticamente, se reconocen como especies dentro del clado *Trichomonasvirus*. La presencia de los virus se asoció con el polimorfismo genético del parásito. Particularmente, el marcador genético de RAPD Tv-5<sub>490</sub> asociado a la virulencia, sugiere la presencia de una proteína de superficie con repeticiones ricas en leucina involucrada en la entrada de los virus a otros protozoos. Estos resultados demuestran el papel que juega el parásito para la entrada de los virus, así como permiten especular sobre el hábitat natural de los VTVs y el posible mecanismo de entrada de los VTVs al parásito. Se comprobó que la infección viral influye en una mejor adhesión de *T. vaginalis* a las células HeLa, particularmente los parásitos infectados con la especie VTV-2 y se demostró que la infección del parásito con los virus se asocia con la presencia e intensidad de las manifestaciones clínicas de las pacientes de donde fueron obtenidos los aislamientos. Estos resultados sustentan el papel de los VTVs en la virulencia de *T. vaginalis*.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Introducción	5
1.2. Hipótesis	5
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	6
1.4. Novedad Científica	6
1.5. Valor Teórico	7
1.6. Valor Práctico	7
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>	8
2.1. Clasificación taxonómica y características morfológicas de <i>T. vaginalis</i>	8
2.2. Ciclo de vida	10
2.3. Manifestaciones clínicas	12
2.4. Epidemiología	14
2.5. Genoma de <i>T. vaginalis</i>	16
2.6. Patogénesis	17
2.6.1. Proteínas de superficie, adhesión y adhesinas	17
2.6.2. Hemólisis	23
2.6.3. Proteinasas	23
2.6.4. Mecanismos de patogenicidad independientes del contacto	24
2.6.5. Interacción con la microbiota vaginal	25
2.6.6. Evasión de la respuesta inmune	26
2.6.7. Virus de <i>T. vaginalis</i> (VTVs)	28
2.7. Métodos utilizados para evaluar la variabilidad genética entre aislamientos de <i>T. vaginalis</i>	33
2.7.1. Técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	35
2.7.2. Análisis del polimorfismo genético entre aislamientos de <i>T. vaginalis</i> mediante la técnica de RAPD. Su relación con fenotipos clínicos y biológicos	36

	<b>Pág.</b>
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	39
3.1. Materiales	39
3.2. Tipo de estudio	39
3.3. Universo de Trabajo	39
3.4. Obtención de ácidos nucleicos	40
3.4.1. Obtención total de ácidos nucleicos (ADN/ARN)	40
3.4.2. Detección de ARNdc y ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa	41
3.4.3. Obtención de ADN genómico	41
3.4.4. Determinación de la concentración y calidad del ADN genómico	42
3.5. Purificación de los VTVs y obtención de los ARNdc genómicos	42
3.6. Ensayo de sensibilidad del ARN obtenido de los VTVs	43
3.7. Tipificación de la especie de VTVs mediante Reacción en Cadena de Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-RCP)	43
3.8. Secuenciación y análisis filogenético de los VTVs	45
3.8.1. Secuenciación nucleotídica y análisis del genoma viral de los VTVs	45
3.8.2. Análisis filogenético de los VTVs obtenidos de aislamientos cubanos de <i>T. vaginalis</i>	46
3.9. Análisis del polimorfismo genético de los aislamientos de <i>T. vaginalis</i> y su asociación con la presencia de VTVs	47
3.9.1. Detección de aislamientos infectados con especies de la clase <i>Mollicutes</i>	47
3.9.2. Técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	49
3.9.3. Análisis del polimorfismo genético de los aislamientos	50
3.9.4. Prueba estadística de concordancia de árboles	50
3.10. Caracterización genética de marcadores de RAPD asociados a la virulencia	51
3.10.1. Clonaje y secuenciación de los fragmentos de RAPD	51
3.10.2. Análisis de las secuencias	52
3.11. Relación entre la presencia de VTVs y su especie con el nivel de adhesión de los aislamientos de <i>T. vaginalis</i> a las células HeLa	52
3.12. Relación entre la presencia de VTVs y las manifestaciones clínicas de las pacientes	53
<b>IV. RESULTADOS</b>	54
4.1. Presencia y tipificación de los VTVs en aislamientos cubanos de <i>T. vaginalis</i>	54
4.2. Caracterización y análisis de la secuencia genómica de tres aislamientos de VTVs	58
4.3. Análisis filogenético de los VTVs y la familia <i>Totiviridae</i>	63
4.4. Análisis del polimorfismo genético de los aislamientos de <i>T. vaginalis</i> mediante la técnica del RAPD y su asociación con la presencia de VTVs	68
4.4.1. Extracción de ADN genómico de aislamientos de <i>T. vaginalis</i>	68
4.4.2. Detección de especies de la clase <i>Mollicutes</i> en aislamientos de <i>T. vaginalis</i>	69

	<b>Pág.</b>
4.4.3. Polimorfismo genético de los aislamientos y su asociación con la presencia de VTVs	70
4.5. Caracterización de marcadores genéticos de RAPD asociados a la virulencia	74
4.6. Asociación entre la presencia y especie de los VTVs con la adhesión de los aislamientos del parásito	76
4.7. Asociación entre la presencia de los VTVs y las manifestaciones clínicas de los pacientes	77
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
5.1. Presencia y tipificación de VTVs en aislamientos cubanos de <i>T. vaginalis</i>	80
5.2. Caracterización genética de tres aislamientos de VTVs y análisis filogenético de los VTVs y la familia <i>Totiviridae</i>	82
5.3. Asociación entre el polimorfismo genético de los aislamientos de <i>T. vaginalis</i> y la presencia de los VTVs	85
5.4. Caracterización de marcadores genéticos de RAPD asociados a la virulencia	91
5.5. Asociación entre la presencia y especie de los VTVs con la adhesión de los aislamientos de <i>T. vaginalis</i> y las manifestaciones clínicas	93
5.6. Discusión general	98
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>100</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>101</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>102</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR</b>	<b>125</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>128</b>

# ***INTRODUCCIÓN***

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Introducción

*Trichomonas vaginalis*, el agente etiológico de la trichomoniasis humana, es un protozoo causante de vaginitis y de afectaciones ocasionales del exocérvix y la uretra (Muller, 1983). La trichomoniasis es la forma más común de enfermedad sexualmente transmitida de origen parasitario (Brown, 1972). Se considera una de las parasitosis más frecuentes y se informan alrededor de 160 a 180 millones de casos en el mundo anualmente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la trichomoniasis representa la causa de la mitad de todas las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) (WHO, 2001; Harp y Chowdhury, 2011; Preethi *et al.*, 2011). Las mujeres que adquieren la infección con el parásito durante el embarazo están predispuestas a una ruptura prematura de la membrana placentaria así como niños de bajo peso al nacer (Minkoff *et al.*, 1984; Cotch, 1990; Klebanoff *et al.*, 2001). También se relaciona con el cáncer cervical (Zhang y Begg, 1994), las enfermedades inflamatorias pélvicas atípicas (Heine y Mc Gregor, 1993), la infertilidad (Grondstein *et al.*, 1993; El-Shazly *et al.*, 2001) y se plantea que puede incrementar la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Laga *et al.*, 1994; Sorvillo y Kerndt, 1998; Sorvillo *et al.*, 2001; Moodley *et al.*, 2002; McClelland *et al.*, 2007) así como del *Papilomavirus* humano y *Mycoplasma hominis* (Hernández *et al.*, 2009).

Cerca del 50 % de las mujeres que contraen esta parasitosis suelen ser asintomáticas; el resto pueden presentar síntomas tales como prurito, disuria y dispareunia, y signos como leucorrea y eritema vulvar, vaginal y cervical (Donné 1936; Krieger *et al.*, 1990a; Harp y Chowdhury, 2011). En los hombres la enfermedad se presenta de forma asintomática en un gran número de casos (cerca de 70%), aunque algunos pacientes pueden presentar prurito, uretritis con o sin secreciones purulentas, epididimitis y prostatitis (Krieger, 1995; Sood y Kapil, 2008; Fichorova, 2009). Se asocia además con la reducción de la movilidad de los espermatozoides y

la infertilidad (Harp y Chowdhury, 2011). Recientemente, se describió que puede incrementar el riesgo de padecer cáncer de próstata (Stark *et al.*, 2009). A pesar de los planteamientos anteriores, *T. vaginalis* se considera uno de los parásitos menos estudiados con respecto a su virulencia, patogenicidad e inmunopatogénesis (Harp y Chowdhury, 2011).

La relación hospedero-parásito en el curso de la trichomoniasis es muy compleja y la variedad de síntomas clínicos no puede atribuirse a un solo mecanismo de patogenicidad. El mecanismo exacto de patogenicidad, así como los factores que influyen en las variaciones de las manifestaciones clínicas, aún no están claramente dilucidados, aunque se plantean diferentes aspectos que intervienen en la patogénesis de la trichomoniasis como son: las proteínas de superficie del parásito que participan en la adhesión a la célula hospedera, la adquisición de nutrientes (Alderete, 1988), la hemólisis (Krieger *et al.*, 1983; Dailey *et al.*, 1990; Fiori *et al.*, 1993), la excreción de factores solubles tales como proteinasas extracelulares (Garber y Lemchuk-Favel 1994; Mallinson *et al.*, 1994), la interacción con residentes de la microbiota vaginal (McGrory *et al.*, 1994) y los mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero (Demes *et al.*, 1988; Alderete *et al.*, 1992; Provenzano y Alderete, 1995).

La expresión de algunos factores de virulencia en *T. vaginalis*, se han correlacionado con la presencia de virus ARN de doble cadena (ARNdc), denominados virus de *T. vaginalis* (VTVs) (Wang y Wang, 1985; Wang y Wang, 1991). La organización genómica y la diversidad genética identifican a los VTVs como miembros legítimos de la familia *Totiviridae* (Wang *et al.*, 1993). Cuatro géneros dentro de la familia se reconocen en la actualidad: *Giardiavirus*, *Leishmanivirus*, *Totivirus* y *Victorivirus* (Ghabrial, 2008). Los virus que infectan protozoos se agrupan en dos géneros (*Giardiavirus* y *Leishmanivirus*), mientras que los otros dos géneros infectan hongos. En particular, los VTVs se agrupan actualmente como un miembro tentativo del género *Giardiavirus*, como una sub-especie, lo que se basa simplemente en que *Trichomonas* y *Giardia* presentan el mismo hospedero (Catalogue of Life, 2007). Estudios recientes de secuenciación de los genomas virales y estudios filogenéticos, sugieren que los VTVs no están tan estrechamente relacionados con *Giardiavirus* como para garantizar su posición dentro del mismo género y se sugiere que formen un género aparte denominado *Trichomonasvirus* (Bessarab *et al.*, 2011; Goodman *et al.*, 2011a,b). Tomando en

consideración que existen escasos datos informados sobre las características genéticas y biológicas de estos virus, se impone ampliar los estudios relacionados con la secuenciación y filogenia de estos virus para llegar a conclusiones sobre su posición taxonómica dentro de la familia *Totiviridae* así como su estructura poblacional dentro del género.

El nivel de infección de aislamientos de *T. vaginalis* infectados con VTVs varía entre 44 y 82 % en los diferentes informes (Wang *et al.*, 1987; Vanáčová *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 2000; Hampl *et al.*, 2001b; Wendel *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003, Conrad *et al.*, 2012). Sin embargo, se considera que se han informado muy pocos estudios relacionados con la detección de estos virus en aislamientos del parásito a nivel mundial y no existen estudios en la región de América Latina y el Caribe. Hoy es importante no solo determinar la presencia de VTVs en los aislamientos, sino además conocer la especie infectante, con vistas a conocer su distribución global. En este sentido solo se han estudiado a nivel mundial 22 VTVs correspondientes a 9 aislamientos de *T. vaginalis* (Tai e Ip, 1995; Su y Tai, 1996; Kim *et al.*, 2007; Bessarab *et al.*, 2000; 2011; Goodman *et al.*, 2011a,b). De ahí la necesidad de determinar la presencia de VTVs en aislamientos del parásito y la especie circulante entre los aislamientos.

Por otra parte, no se conoce si los VTVs son habitantes naturales del parásito o son adquiridos del hospedero en que reside el protozoo (Pindak *et al.*, 1989) y por ende está por definir el mecanismo por el cual los VTVs penetran a *T. vaginalis* y si esa infección depende de las características propias del parásito, lo que explicaría en parte el hecho de encontrar aislamientos infectados y otros no infectados con VTVs. La presencia o no de VTVs observados en los aislamientos del parásito pudiera estar asociada a las variaciones genotípicas de *T. vaginalis*. Estas variaciones del genoma marcan las diferencias en cuanto a la patogenicidad, manifestaciones clínicas y susceptibilidad al metronidazol, demostradas en muchos agentes infecciosos (Cornelious *et al.*, 2010).

El polimorfismo genético entre los aislamientos de *T. vaginalis* se ha demostrado mediante la utilización de diferentes métodos: la técnica de hibridación molecular (Ryu *et al.*, 1998), la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en

inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen *hsp70* (Stiles *et al.*, 2000; Meade *et al.*, 2009; Cornelius *et al.*, 2010), la secuenciación del gen ribosomal 5,8S (Snipes *et al.*, 2000) y el análisis de microsatélites (Conrad *et al.*, 2011; Prokopi *et al.*, 2011; Conrad *et al.*, 2012). Otra técnica molecular, el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, siglas en inglés Random Amplified Polymorphic DNA), se ha utilizado en investigaciones epidemiológicas, en estudios cuyo objetivo es conocer el polimorfismo genético y su relación con los diferentes fenotipos clínicos y las características biológicas de los aislamientos de *T. vaginalis* tales como: las manifestaciones clínicas en las pacientes, la presencia de VTVs, la susceptibilidad al metronidazol, la presencia de *Mycoplasmas* y la virulencia de los aislamientos (Vanáčová *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 2000; Hampl *et al.*, 2001b; Kaul *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2004a; Xiao *et al.*, 2006; 2008; Valadkhani *et al.*, 2011).

La asociación entre el polimorfismo genético de los aislamientos y la infección con los VTVs se estudió con anterioridad mediante las técnicas de RAPD, RFLP y microsatélites (Vanáčová *et al.*, 1997; Hampl *et al.*, 2001b; Snipes *et al.*, 2000; Hussien *et al.*, 2005; Conrad *et al.*, 2012), sin embargo, se encontraron resultados contradictorios en los diferentes estudios, de ahí la necesidad de realizar nuevos estudios con vistas a corroborar o no esta asociación y de esta manera contribuir a los estudios relacionados con la determinación del hábitat de estos VTVs y la forma de entrada al parásito.

El papel de los VTVs en la patogenia de la trichomoniasis queda aún por determinar (Sood y Kapil, 2008). No existen informes que relacionen la presencia de los mismos con cambios en la virulencia de *T. vaginalis*. No obstante, si tenemos en cuenta que las infecciones con estos virus pueden modular la traducción y expresión de las proteínas inmunogénicas del parásito como: la expresión de la proteína altamente inmunogénica P270 (Khoshnan y Alderete, 1994) y la expresión diferencial cualitativa y cuantitativa de cisteíno proteinasas, que juegan un papel importante en la citoadherencia al epitelio vaginal, la citotoxicidad, y la degradación de los componentes de membrana (Provenzano *et al.*, 1997), es posible entonces, que la presencia de los mismos pueda modular la virulencia de la infección con *T. vaginalis* y conllevar a posibles diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, la resistencia a drogas, la carga parasitaria y la transmisibilidad (Wendel *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003;

Goodman *et al.*, 2011a). Lo anteriormente expuesto apoya la necesidad de determinar cómo se afectan las manifestaciones clínicas o la morbilidad de la trichomoniasis debido a la presencia de virus en *Trichomonas* así como la relación de la infección viral con la virulencia del parásito (Wendel *et al.*, 2002).

En el presente estudio nos propusimos abordar uno de los posibles factores de virulencia en el curso de la infección por *T. vaginalis*, los VTVs y para ello comenzamos por determinar la presencia de los VTVs en aislamientos cubanos de *T. vaginalis*, estudio que se realizó por primera vez en Cuba. Seguidamente se analizaron las relaciones filogenéticas de VTVs cubanos y el resto de los VTVs secuenciados dentro de la familia *Totiviridae*, con vistas a proponer y determinar su posición taxonómica y finalmente evaluamos el papel del parásito para la infección con los virus y la asociación de la presencia de los VTVs con la virulencia que ejerce el parásito.

## **1.2. Hipótesis**

Los virus de *Trichomonas vaginalis* se agrupan en el género *Trichomonasvirus* y pueden incidir en la virulencia que ejerce el parásito.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general:**

Determinar las relaciones filogenéticas de virus de *Trichomonas vaginalis* dentro de la familia *Totiviridae* y la asociación de estos con la virulencia de *T. vaginalis*.

### **1.3.1. Objetivos específicos:**

1. Identificar las especies de VTVs presentes en los aislamientos cubanos del parásito.
2. Determinar las relaciones filogenéticas entre los VTVs con otros miembros de la familia *Totiviridae*.
3. Evaluar la posible asociación entre el polimorfismo genético de los aislamientos cubanos del parásito y la presencia de los VTVs.

4. Caracterizar los marcadores genéticos relacionados con la virulencia del parásito en aislamientos cubanos.
5. Determinar la influencia de la presencia de los VTVs en la adhesión del parásito a células HeLa.
6. Evaluar la asociación entre la presencia de VTVs en los aislamientos cubanos del parásito y las manifestaciones clínicas de las pacientes de donde proceden los aislamientos.

#### **1.4. Novedad Científica**

1. Se demostró por primera vez la presencia de los VTVs en aislamientos cubanos de *T. vaginalis* y solo se encontró la presencia de las especies VTV 1 y 2 en los aislamientos estudiados, lo que constituye el primer estudio de este tipo en Cuba y en la región de América Latina y el Caribe.
2. Se realizaron aportes en relación a la clasificación taxonómica de los VTVs. Los mismos forman un grupo monofilético separado del resto de los miembros de la familia *Totiviridae* lo que apoya su clasificación como un género aparte (*Trichomonasvirus*). Dentro del género se observan cuatro grupos monofiléticos bien separados que constituyen especies bien definidas.
3. Se demostró la asociación entre el polimorfismo genético del parásito y la infección con VTVs, lo que aporta elementos en el papel del parásito en la infección con los VTVs y la predisposición genética para la adquisición y/o supervivencia de los VTVs.
4. Se caracterizó un marcador genético de virulencia, el cual se corresponde con una proteína receptora, que pudiera estar relacionada con la entrada de los VTVs a *T. vaginalis*, de esta forma se evidenció la participación del parásito en la infección con los VTVs y el hecho de que los VTVs son habitantes naturales del hospedero donde el parásito reside, pudiéndose especular sobre el mecanismo de entrada de los virus al parásito.
5. Se demostró por primera vez, a nivel internacional, que los aislamientos infectados con VTVs presentan un mayor nivel de adhesión a células HeLa en comparación con los aislamientos no infectados, en particular, los aislamientos infectados con la especie VTV-2 presentan los mayores niveles de adhesión y la significación clínica de la presencia de VTVs a partir de su asociación con las manifestaciones clínicas de las pacientes de las

cuales proceden los aislamientos, lo que demuestra que los VTVs inciden en la virulencia del parásito.

### **1.5. Valor Teórico**

1. La determinación del genoma completo de tres aislamientos cubanos de VTVs permitirá realizar estudios filogenéticos futuros lo que contribuye al conocimiento de la comunidad científica internacional.
2. Este trabajo contribuye con los estudios de los factores relacionados con la virulencia del parásito al demostrar la influencia de los VTVs en las manifestaciones clínicas, en la relación hospedero-parásito y con otras propias de los aislamientos como la adhesión y el polimorfismo genético.

### **1.6. Valor Práctico**

1. Las nuevas secuencias de VTVs obtenidas constituyen herramientas de trabajo para los investigadores en el campo de las relaciones filogenéticas.
2. Los resultados obtenidos en esta investigación, serán útiles como base para estudios futuros sobre la relación patógeno-hospedero, que a su vez pudieran ser utilizados para prevenir, diagnosticar y tratar la enfermedad de manera adecuada.
3. Se introdujo en el laboratorio de Parasitología del IPK, el método de RT-RCP para la tipificación de especies de VTVs, lo que servirá de base para nuevas investigaciones.

***REVISIÓN***  
***BIBLIOGRÁFICA***

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Clasificación taxonómica y características morfológicas de *T. vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo parásito descubierto por Alfred Donné en 1836 y designado con este nombre por Enrenberg en 1838.

La posición taxonómica de *T. vaginalis*, se basa en el esquema de clasificación de Dyer (1990):

Phylum: Zoomastigina (Posee flagelo).

Clase: Parabasalia (Presencia de un cuerpo parabasal, aparato de golgi asociado con kinetosoma, axostilo, membrana ondulante, extensión de membrana plasmática, flagelo cubierto (envainado)).

Orden: Trichomonadida (4 a 6 flagelos libres o unidos a una membrana ondulante, no forma quistes).

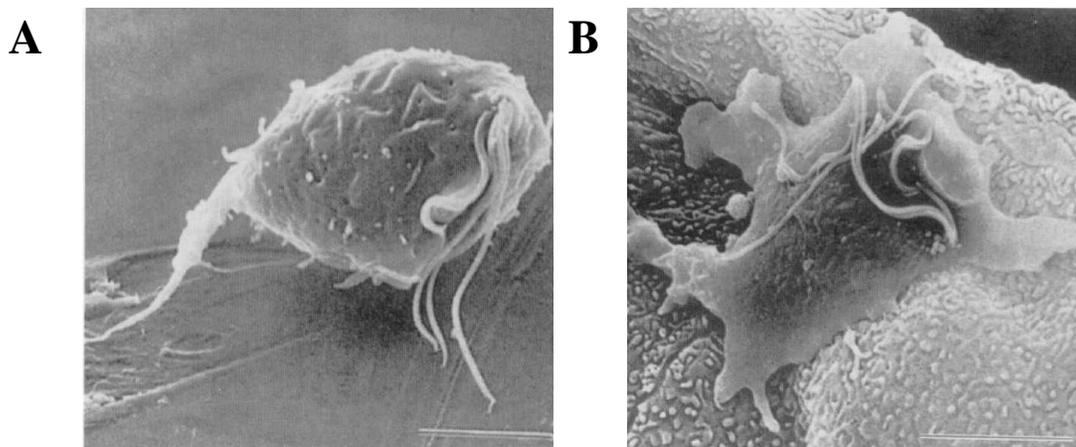
Familia: Trichomonadidae (Presencia de citostoma, 3 a 5 flagelos libres, 1 flagelo ondulante, axostilo protuberante en la parte posterior).

Género: *Trichomonas* (4 flagelos libres, uno recurrente, la costa en la base de la membrana ondulante, un axostilo que se extiende a través de la célula)

Especie: *Trichomonas vaginalis*.

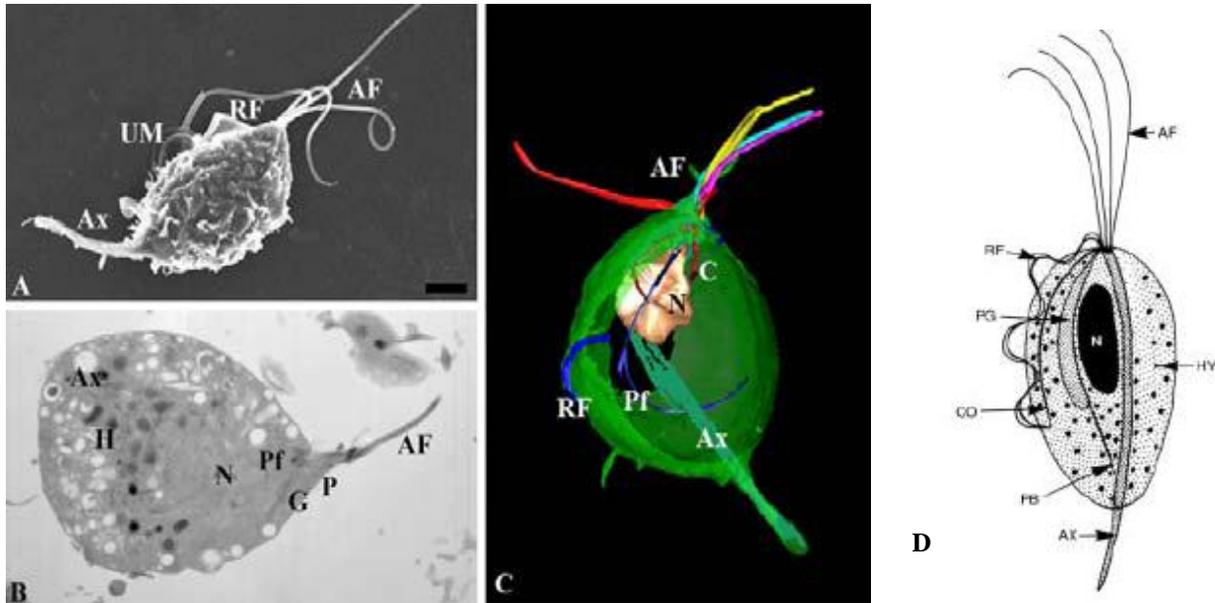
*T. vaginalis* es la especie de mayor tamaño dentro del género *Trichomonas*, mide entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ , (13  $\mu\text{m}$  de media) (Honigberg *et al.*, 1984), con variaciones que dependen de las condiciones ambientales. Posee un tamaño mayor que los leucocitos polimorfonucleares y menor que las células epiteliales. En cultivos axénicos, se describe como un protozoo de vida libre de aspecto piriforme (Figura 1A), pero en co-cultivos con células de mamíferos, como

células epiteliales vaginales (CEV), adopta una forma ameboide, donde se evidencia una unión con las células mediante fagocitosis tanto “in vivo” como “in vitro” (Figura 1B) (Heath, 1981; Arroyo *et al.*, 1993).



**Figura 1.** *Trichomonas vaginalis* en cultivo (A) y aspecto ameboide del parásito (B). Tomado de Petrin *et al.*, 1998.

*T. vaginalis* presenta un núcleo oval, redondeado y cubierto por una membrana nuclear con un pequeño carisoma y gránulos dispersos de cromatina, aparato de golgi, un cuerpo parabasal, cuatro flagelos anteriores y un quinto flagelo que se dispone por todo el borde libre de la membrana ondulante, que origina la motilidad típica del parásito. Presenta un axostilo posterior largo, verdadero esqueleto que recorre el cuerpo celular, desde la extremidad anterior hasta la posterior (Figura 2) (Krieger, 1981; Campbell, 2001; Lee *et al.*, 2009). Además, posee gránulos cromáticos denominados hidrogenosomas, que son análogos biológicos y estructurales de las mitocondrias, organelos sin ADN, donde ocurre la fermentación del piruvato, relacionado con el catabolismo de los carbohidratos (Muller, 1988).



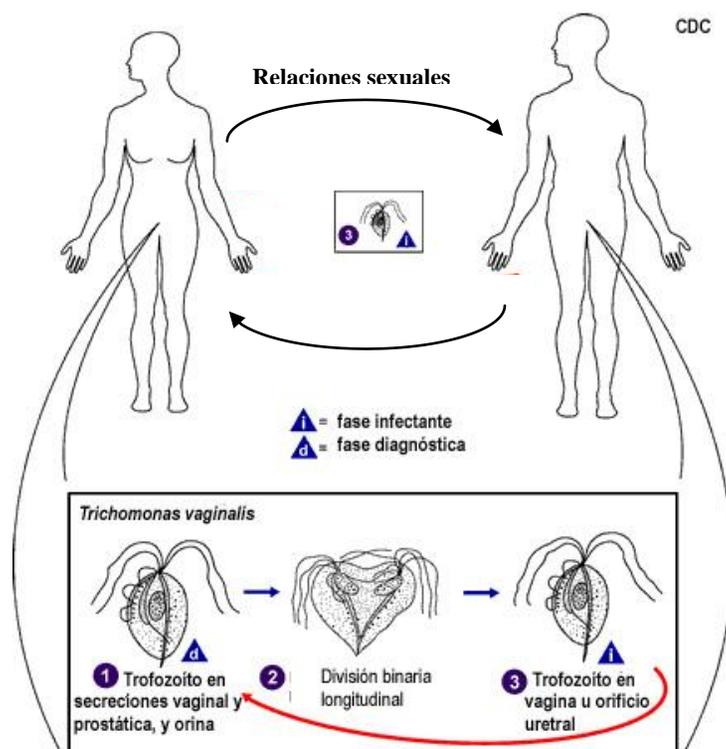
**Figura 2. Estructura de *T. vaginalis*. A) Imagen de Microscopio Electrónico de barrido. B) Imagen de microscopio electrónico de transmisión. C) Estructura tridimensional. D) Dibujo en el que se muestran los aspectos esenciales de la morfología de *T. vaginalis*. AF: flagelos anteriores; Ax: axostilo; CO o C: costa; HY o H: hidrogenosoma; N: núcleo, PB o Pf: filamento parabasal; PG o G: aparato de golgi; RF: flagelo recurrente; UM, membrana ondulante. A, B y C tomadas de Lee *et al.*, 2009 y D de Harp y Chowdhury, 2011**

La característica fundamental que permite la visualización del parásito es su motilidad típica, con movimientos que simulan sacudidas o temblores. Es un organismo dependiente de la vía glicosílica, con temperaturas óptimas de crecimiento de 37°C, y pierden rápidamente su motilidad a temperatura ambiente; mientras que las temperaturas superiores a 45°C y la desecación son letales para el parásito. Crece en medio alcalino y no sobrevive en agua destilada puesto que en pocos minutos se muere por hipotonicidad y son microorganismos anaeróbicos por excelencia (Whittington, 1957; Muller, 1988).

## 2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida no se conoce con exactitud (Petrin *et al.*, 1998). Se plantea que el parásito reside en el tracto genital femenino y en la próstata, uretra y epidídimo en los hombres, donde

se replica por división binaria. Se reproduce en las vías urinarias y genitales en forma de trofozoito y no existe la forma quística (Honigberg 1984). El hombre es el único hospedero natural conocido y la infección tiene como mecanismo de transmisión principal el contacto sexual (Figura 3).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. Tomado de: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/images/trichomonas\\_ciclo-b.jpg](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/images/trichomonas_ciclo-b.jpg)

*T. vaginalis* posee una elevada especificidad para unirse solamente a las células epiteliales del tracto genitourinario. Una vez implantado, el microorganismo es capaz de obtener nutrientes a partir de las bacterias y leucocitos presentes en el medio, además de destruir las células del hospedero, donde se producen lesiones superficiales, ya que el parásito es incapaz de penetrar a los tejidos del hospedero (Enghring y Alderete, 1998).

La causa principal de la afectación producida por *T. vaginalis* se encuentra en la acción mecánica del parásito sobre las mucosas genitales, que derivan en procesos inflamatorios y en la acción tóxico-alérgica producida por las alteraciones citoplasmáticas y nucleares de las células de la mucosa (Petrin *et al.*, 1998)

### **2.3. Manifestaciones clínicas**

La trichomoniasis presenta un amplio intervalo de patrones clínicos. En la mujer las manifestaciones clínicas van desde las formas asintomáticas hasta sintomáticas severas, de ahí que se clasifican en asintomática y sintomática (aguda o crónica) (Petrin *et al.*, 1998).

*T. vaginalis*, infecta principalmente el epitelio escamoso del tracto genital. La infección, una vez establecida, persiste por largos períodos de tiempo en las mujeres, pero solo por un corto intervalo en los hombres. El período de incubación es de cuatro a 28 días, en aproximadamente 50 % de los individuos infectados (Rein y Muller, 1990; Harp y Chowdhury, 2011).

La trichomoniasis en el tracto genital femenino se traduce en una vulvovaginitis, cuyo principal síntoma es la leucorrea, este flujo no siempre se presenta con los rasgos clásicos de color amarillento o aspecto espumoso y maloliente, sino que es posible identificar flujos grisáceos y blanquecinos. Esta leucorrea irrita la mucosa genital lo que ocasiona vulvitis. La vagina y el cérvix de las pacientes con la enfermedad pueden encontrarse eritematosos y edematosos. El cérvix, en su porción malpigiana, se presenta con erosión general del epitelio y se puede observar enrojecido con petequias de fácil sangrado denominado “cérvix en fresa”, lo que determina la colpitis macularis. Los principales síntomas y signos de la trichomoniasis femenina se muestran en la Tabla 1 (Vázquez *et al.*, 1993; Schwebke y Bruggess, 2004; Soper, 2004; Sood y Kapil, 2008; Harp y Chowdhury, 2011).

**Tabla 1. Frecuencia de los síntomas y signos de la trichomoniasis femenina.**

Síntomas	Frecuencia (%)	Signos	Frecuencia (%)
Ninguno	9- 56	Ninguno	15
Prurito vulvar	20- 80	Leucorrea	50- 78
		Maloliente	10- 67
		Pruriginosa, irritativa	23- 82
Disuria	18- 50	Leucorrea amarillenta, verdosa	50- 75
Dispareunia	10- 50	Leucorrea espumosa	8- 50
Molestias abdominales	5- 12	Leucorrea espesa	50
		Eritema vaginal	30- 37
		Eritema vulvar	10- 37
		Eritema cervical "cervix en fresa"	
		Diagnóstico visual	1-2
		Colposcopia	45

**Fuente:** Vázquez *et al.*, 1993; Schwebke y Brugess 2004; Soper, 2004; Sood y Kapil, 2008; Harp y Chowdhury, 2011.

La infección aguda revela una vulvitis difusa, debido a una leucorrea abundante amarillenta o verdosa y mucopurulenta y el "cervix en fresa" que se observa en el 2 % de las pacientes (Fouts y Kraus, 1980; Rein, 1990; Schwebke y Brugess, 2004; Soper, 2004). En la infección crónica, los síntomas predominantes son leves con prurito y dispareunia, mientras que la secreción vaginal puede ser muy escasa y mezclada con moco, esta forma de la enfermedad es particularmente importante, desde el punto de vista epidemiológico (Nicolsetti, 1961).

Del 25 al 50 % de las mujeres infectadas son asintomáticas y tienen un pH vaginal ácido (entre 3,8 a 4,2) así como una microbiota vaginal normal (Spiegel, 1990; Soper, 2004). Sin embargo, se plantea que el 50 % de estas mujeres desarrollan síntomas clínicos a partir de los seis meses siguientes (Harp y Chowdhury, 2011).

Se considera que la vaginitis es la manifestación clínica más común en mujeres infectadas con *T. vaginalis*. Las complicaciones asociadas a la trichomoniasis en las mujeres son la endometritis (Rein y Chapel, 1975), la infertilidad (Grodstein *et al.*, 1993; El-Shazly *et al.*, 2001), las infecciones inflamatorias pélvicas atípicas (Heine y McGregor, 1993;

Paisarntantiwong *et al.*, 1995) y el incremento del riesgo de padecer cáncer cervical (Sayed *et al.*, 2002).

Poco es conocido acerca de la infección de *T. vaginalis* en hombres, la cual generalmente cursa de manera asintomática, por ello se consideran en su mayoría como portadores asintomáticos de *T. vaginalis*. La trichomoniasis urogenital en hombres se puede dividir en tres grupos: Estado de portador asintomático, trichomoniasis aguda (caracterizado por una uretritis) y la enfermedad sintomática leve que es clínicamente indistinguible de las uretritis gonococcica. La duración de la infección es de 10 días o menos en la mayoría de los hombres (Harp y Chowdhury, 2011).

En los hombres sintomáticos, las principales manifestaciones son: descarga escasa, desde clara a mucopurulenta, disuria, prurito ligero e irritación uretral ligera (algunos la describen como una quemazón característica después del coito) (Krieger, 1990). Entre las complicaciones se pueden mencionar la uretritis gonococcica, prostatitis, balanopostitis, epididimitis, enfermedad uretral e infertilidad, aunque la función de *T. vaginalis* en la infertilidad, aún no está definida con exactitud (Tuttle *et al.*, 1977; Krieger, 1984; Fichorova, 2009; Harp y Chowdhury, 2011). Recientemente, se informó que puede incrementar el riesgo de producir cáncer de próstata (Stark *et al.*, 2009).

Al igual que para las mujeres, la trichomoniasis en hombres se identifica como un factor de riesgo para la transmisión e infectividad del VIH (Sorvillo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Moodley *et al.*, 2002; McClelland *et al.*, 2007).

#### **2.4. Epidemiología**

Los seres humanos son los únicos hospederos naturales de *T. vaginalis*. Se calcula que anualmente se infectan en todo el mundo un aproximado de 160 a 180 millones de personas. Dentro de esta población alrededor de 154 millones de personas son de bajos recursos, entre ocho y 10 millones son de Estados Unidos y 11 millones de Europa (WHO, 2001; McClelland, 2007; Preethi *et al.*, 2011; Harp y Chowdhury, 2011). La infección es venérea en casi todos los casos y la transmisión parece más frecuente de hombres a mujeres. Un aproximado de 70 % de

los hombres tienen la enfermedad en las 48 h siguientes a la exposición, comparado con 85 % de las mujeres expuestas (Rein y Muller, 1990). Otra forma de infección sería durante el parto, donde el parásito puede ser transmitido a neonatos mediante el paso por el canal al estar en contacto con fluidos corporales como orina y exudado vaginal. Entre el 2 al 17 % de los niños nacidos a partir de madres infectadas, desarrollan vaginitis, habitualmente asintomática (al Salihi *et al.*, 1974). La infección durante el baño es altamente improbable, en forma ocasional se puede contraer a través de piscinas, aguas termales, y por el uso compartido de ropa interior, toallas, etc, esta forma de transmisión extravenérea suele presentarse en niñas y mujeres vírgenes (Krieger, 1981).

Aunque se acepta que el contacto sexual con hombres parasitados es la fuente primaria de la infección en las mujeres, no está claro por qué no se detecta con mayor frecuencia en los mismos. Esto podría deberse a que la infección solo es transitoria en los hombres o que la cantidad de parásitos es difícil de detectar, además de ser asintomático. Otra razón pudiera ser la presencia de factores dependientes del hospedero, que condicionan que solo aparezcan síntomas en algunos hombres (Gardner *et al.*, 1987). El semen no inhibe al parásito y parece constituir el vehículo de transmisión (Daly *et al.*, 1989).

La prevalencia de la enfermedad varía entre distintas poblaciones estudiadas, en dependencia de factores como la edad, el estado de salud, la promiscuidad sexual, la higiene y las condiciones socioeconómicas, pero el intervalo se encuentra entre 5-74 % en mujeres y entre 5-29 % en hombres (Swygard *et al.*, 2004; Johnston y Mabey, 2010). La prevalencia depende fundamentalmente de algunos factores de riesgo como la edad, la intensidad de la actividad sexual, el número de parejas sexuales, la fase del ciclo menstrual y los tipos de exámenes de laboratorios realizados para el diagnóstico (Petrin *et al.*, 1998; Johnston y Mabey, 2010). En los Estados Unidos, la prevalencia de trichomoniasis que se informa en hospitales de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) es de alrededor del 25 % y alcanza valores mayores en determinadas poblaciones (Schwebke *et al.*, 1997; Bachmann *et al.*, 2000; Shafir *et al.*, 2009; Johnston y Mabey, 2010). Varios estudios en poblaciones en África describen una prevalencia entre 11 y 25 % (Krieger *et al.*, 1985b; Krieger *et al.*, 1993; Laga *et al.*, 1993; Klouman *et al.*, 1997; Kurth *et al.*, 2004; Johnston y Mabey, 2010; Crucitti *et al.*, 2011). En

Cuba, diferentes estudios revelan una prevalencia de alrededor del 15 % en diferentes grupos de riesgo como: adolescentes, personas viviendo con VIH y en parejas con trastornos de la fertilidad (Rojas *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2003).

Una de las complicaciones asociadas a la trichomoniasis es que facilita la transmisión e infectividad del VIH. Un cálculo teórico concluye que si la infección con *T. vaginalis* incrementa el riesgo de la transmisión del VIH en un 90 %, en una población con una prevalencia del 25 % de trichomoniasis, aproximadamente el 20 % de los casos con VIH pudieran ser atribuidos a esta parasitosis (Sorvillo *et al.*, 2001; Moodley *et al.*, 2002; McClelland *et al.*, 2007). Esta relación puede explicar algunas de las diferencias en los niveles de infección de VIH en diferentes regiones de África, donde los niveles de trichomoniasis y VIH son directamente proporcionales (Buve *et al.*, 2001). Estudios “in vitro” demuestran que las partículas de VIH son incorporadas a *T. vaginalis* mediante las vesículas endocíticas y degradadas en las vesículas citoplasmáticas en aproximadamente 48 h. No obstante, no hay evidencias ultraestructurales de replicación en los parásitos, pero las partículas VIH-1 internalizadas permanecen viables en *T. vaginalis* por cortos períodos de tiempo (Rendon-Maldonado *et al.*, 2003).

### **2.5. Genoma de *T. vaginalis***

El genoma de *T. vaginalis* se describió a partir del aislamiento G3 del parásito (ATCC, siglas en inglés American Type Culture Colection PARA-98, Humano, 1973, Inglaterra) y resultó en aproximadamente 160 megabases de tamaño, organizado en seis cromosomas (Carlton *et al.*, 2007), 10 veces mayor que lo predicho a partir del tamaño de los cromosomas (Lehker y Alderete, 1999). Alrededor de dos tercios de la secuencia del genoma consiste de elementos repetitivos y de transposición, lo que refleja una expansión masiva evolutiva reciente del genoma. El número total de genes que codifican proteínas predictivas es de aproximadamente 98 000, dentro de las que se incluyen aproximadamente 38 000 genes repetidos. Se han clasificado alrededor de 26 000 genes que codifican proteínas, mientras que del resto, no se conoce su función (Carlton *et al.*, 2007).

A finales del año 2007, se dio a conocer de forma pública y libre el sitio web [TrichDB.org](http://TrichDB.org) como un almacén de datos del genoma de este parásito, que permitiera el servicio de recuperación de los datos de su genoma. Hoy el sitio contiene todos los proyectos de datos de las secuencias de *T. vaginalis*, diferentes genotecas de marcadores de secuencias expresadas (EST, siglas en inglés expressed sequence tag), y herramientas para analizar y ver los datos. [TrichDB](http://TrichDB) es parte de [NIH/NIAID](http://NIH/NIAID) fundada por [EupathDB](http://EupathDB), proyecto de base de datos funcionales de genomas (Aurrecochea *et al.*, 2009).

## **2.6. Patogénesis**

La relación hospedero-parásito en el curso de esta enfermedad es muy compleja y el intervalo amplio de síntomas clínicos probablemente no pueda ser atribuible a un solo mecanismo de patogenicidad (Petrin *et al.*, 1998; Sood y Kapil, 2008).

En la actualidad, el mecanismo exacto de patogénesis se desconoce (Sood y Kapil, 2008). Honingberg *et al.* (1984) definieron la estructura y función de las *Trichomonas* mediante el análisis microscópico y bioquímico, así como la interacción citoquímica entre el parásito y las células hospederas. Las investigaciones actuales tienen como objetivo principal investigar los eventos iniciales que se requieren para el establecimiento de la infección. Muchos de estos mecanismos son a través de la adhesión célula-célula (Alderete y Garza, 1985; Engbring y Alderete, 1998), la hemólisis (Fiori *et al.*, 1993), la excreción de factores solubles tales como las proteinasas extracelulares (Álvarez-Sánchez, 2000; Mendoza-Lopez *et al.*, 2000) y el factor de desprendimiento celular (CDF, siglas en inglés Cell Detaching Factor) (Garber y Lemchuk-Favel, 1990). Además, la interacción de *T. vaginalis* con la microbiota vaginal puede ser también un factor importante en el establecimiento de la infección (Sobel, 1999). Como ocurre en otros protozoos, *T. vaginalis* muestra varios mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero (Alderete y Garza, 1985; Provenzano y Alderete, 1995).

### **2.6.1. Proteínas de superficie, adhesión y adhesinas**

La adhesión de las *Trichomonas* a las CEV es una etapa crítica en la patogénesis del parásito (Engbring y Alderete, 1998). La superficie de las *Trichomonas* se considera como un mosaico de proteínas de superficie, adhesinas, receptores de proteínas de la matriz extracelular del

hospedero y de carbohidratos, los cuales proporcionan las bases para la unión ligando-receptor (Bonilha *et al.*, 1995; Engbring y Alderete, 1998; Ryan *et al.*, 2011). Después de la citoadhesión, *T. vaginalis* se transforma en una estructura ameboide con un incremento de la superficie de contacto entre célula-célula, y se forma una protección citoplasmática (Arroyo *et al.*, 1993; Harp y Chowdhury, 2011).

Las proteínas de superficie de las *Trichomonas* juegan un papel importante en la adhesión, interacción hospedero-parásito y en la adquisición de nutrientes, de ahí la importancia del análisis molecular de estas macromoléculas de membrana (Sood y Kapil, 2008). El parásito presenta cerca de 300 candidatos de proteínas de superficie que se agrupan en diferentes familias de proteínas con al menos un dominio transmembrana y que comparten uno o más rasgos con otras proteínas de superficie de patógenos (Vogel y Chotia, 2006; Hirt *et al.*, 2007; Harp y Chowdhury, 2011; Ryan *et al.*, 2011).

Los estudios proteómicos se han utilizado para conocer mejor las proteínas de superficie de *T. vaginalis* (de Miguel *et al.*, 2010). El aislamiento de proteínas de superficie mediante la biotinización de las superficies de las células, y su comparación con la tecnología de identificación de proteínas multidimensional, permitió la identificación de un total de 441 proteínas, de ellas 11 se encontraron de forma más abundante en los aislamientos adherentes, en comparación con los menos adherentes (de Miguel *et al.*, 2010). Se identificaron la mayoría de las familias de proteínas predichas como proteínas de membrana, de acuerdo al análisis de las secuencias del genoma y el proceso de anotación (Carlton *et al.*, 2007; Hirt *et al.*, 2007). Así, se reconocieron las proteínas: TvBspA (Proteína de superficie de Bacteroides A), metalopeptidasas similares a GP63, serino peptidasas similares a subtilisina, cisteíno peptidasas similares a calpaina, de membrana polimórfica de *Clamydhia*, antígenos de superficie inmunodominantes variables y la proteína P270. Se detectaron igualmente mediante el análisis proteómico de la superficie de la membrana de este parásito nuevas proteínas que no habían sido identificadas en *T. vaginalis* (de Miguel *et al.*, 2010). Estas incluyen tetraspanins (Hemler, 2003); serino peptidasas similares a rhromid (Freeman 2008); y precursor de nicastrin (Xia y Wolfe, 2003). De forma general, estas proteínas de superficie se

agrupan en tres familias: BspA, GP63 y adhesinas y otras proteínas (Vogel y Chotia, 2006; Hirt *et al.*, 2007; Harp y Chowdhury, 2011; Ryan *et al.*, 2011).

BspA constituye la familia más grande que codifica las proteínas de superficie potenciales y comparten un tipo específico con repeticiones ricas en leucina. La familia GP63, es la segunda familia de genes más grande de candidatos de proteínas de superficie que codifica 77 parálogos y de ellos 53 tienen dominios transmembrana. Otro candidato adicional a esta familia son 28 subtilisinas tipo serino peptidasas, nueve proteasas diferentes del tipo serino y cinco calpains tipo cisteino proteinasas, todas con dominios de transmembrana y funciones como proteasas de superficie que transportan importantes fragmentos de proteínas o pequeños péptidos producto de la generación de energía de aminoácidos o el balance redox. El tercer grupo de proteínas lo constituyen las adhesinas u otras proteínas de superficie que comparten dominios con otras proteínas de superficie relacionadas con patógenos mucosales (Harp y Chowdhury, 2011). Este último grupo se separó en tres categorías: i) el lipofosfoglicano (LPG, siglas en inglés lipophosphoglycan), ii) un grupo controversial de proteínas metabólicas multifuncionales que aparecen con capacidad de adhesión secundaria, y iii) colección de proteínas de membrana identificadas recientemente por estudios de genómica y proteómica (Ryan *et al.*, 2011)

El LPG es el mayor factor de adhesión en *T. vaginalis*, aún cuando no se ha determinado su estructura, se le atribuye la función de adhesión, al unirse a la galectina 1 presente en las CEV y al demostrar su asociación con la virulencia de *T. vaginalis* (Gilber *et al.*, 2000; Harp y Chowdhury, 2011).

Según el estudio de Arroyo *et al.* (1992) la adhesión del parásito a las células epiteliales parece estar mediada por cinco proteínas denominadas proteínas de adhesión (AP siglas en inglés, adhesion protein): AP23, AP33, AP51, AP65, y AP120 (Arroyo *et al.*, 1992), las cuales actúan de un modo específico en la unión receptor-ligando (Arroyo *et al.*, 1993). Se conoce poco sobre los receptores de las células del hospedero con los cuales el parásito se une, sin embargo, existen algunas evidencias de que la laminina constituye una diana para la unión de las *Trichomonas* (Costa e Silva-Filho *et al.*, 2002). La laminina es una glicoproteína

especializada de las células vaginales que se localiza en la membrana basal del epitelio que promueve la adhesión, diferenciación, forma y motilidad de las células epiteliales y se comprobó que posee propiedades quimiotácticas (Costa e Silva Filho *et al.*, 1988), sin embargo, aún resta por definir su papel en la patogénesis de *T. vaginalis*.

Las moléculas de adhesión se consideran hoy como las más controversiales, ya que además de los estudios que demuestran su presencia en la superficie de membrana (Engbring y Alderete, 1998; García y Alderete, 2007), se demostró que con excepción de la AP23, el resto son abundantes en los hidrogenosomas y su función principal es participar en el metabolismo de los carbohidratos (Shiflett y Johnson, 2010). Aún cuando no es irracional la existencia de proteínas con propiedades duales (adhesina/metabólica), se plantea que no reúnen todas las características para definir las como verdaderas proteínas de adhesión (Hirt *et al.*, 2007). En base a esto se plantea que la unión de estas proteínas a las células del hospedero es promiscua y sin especificidad, ya que se demostró que las proteínas AP23, AP33, AP51 y AP65 se unen a varios tipos de células y se unen a estas células sin la presencia de estas proteínas en la membrana (Addis *et al.*, 2000; Hirt *et al.*, 2007). Investigaciones recientes muestran que las proteínas AP51 y AP65 se unen al hemo y a la hemoglobina, una propiedad que paradójicamente apoya su naturaleza promiscua e inespecífica en la adhesión y explica su papel principal en la unión de los nutrientes importantes (Ardarlan *et al.*, 2009). Adicionalmente se informó que la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa juega un papel importante en la adhesión al unirse con la fibronectina de las células del hospedero (Lama *et al.*, 2009). La evidencia definitiva de que las proteínas de función dual tengan función de adhesinas, requerirá encontrar los sitios específicos de unión a las células del hospedero y/o la demostración experimental del tráfico de estas proteínas a la superficie (Hirt *et al.*, 2007).

Los estudios de adhesión del parásito a las células humanas revelan la existencia de otras proteínas involucradas en este proceso como son: las proteínas de unión a fibronectina,  $\alpha$ -actina, enolasa, fosfoglucomutasa y la proteína de unión a guanósín trifosfato (GTP) (Gilber *et al.*, 2000; Harp y Chowdhury, 2011).

Las adhesinas parece que se expresan de forma alterna con una glicoproteína altamente inmunogénica, P270 (Alderete *et al.*, 1992). El gen que codifica esta proteína se secuenció y consiste en una secuencia de 333 pb repetida 18 veces. Este gen se encuentra bien conservado entre las *Trichomonas* pero el número de unidades repetidas puede variar (Alderete, 1999). Este gen de copia simple, además, muestra una regulación por incremento a baja concentración de hierro y alta fosforilación bajo altas concentraciones de hierro (Alderete, 1999).

Debido a que la adherencia de *T. vaginalis* a los tejidos humanos es una etapa crítica e importante en la patogénesis del parásito, la citoadhesión se utiliza como un método “in vitro” para medir la virulencia del parásito (Krieger *et al.*, 1983; Arroyo y Alderete, 1989; Garber y Bowie, 1990; Alderete *et al.*, 1998).

En los ensayos “in vitro” para medir la citoadhesión, es necesario el marcaje de los parásitos, para diferenciarlos del tipo celular que se emplea. Generalmente, se utiliza el marcaje radiactivo de los parásitos con [<sup>3</sup>H]-timidina (Alderete y Garza, 1985) o con [<sup>35</sup>S]-metionina (Krieger *et al.*, 1990a). El empleo de este tipo de marcaje posee algunas desventajas, como por ejemplo, los problemas inherentes a la manipulación de radioisótopos, el requerimiento de un equipamiento especializado y el elevado costo económico. Estos problemas, conllevaron a la búsqueda de alternativas no radioactivas que permitieran realizar estos ensayos.

Rojas *et al.* (2004b), introdujeron la utilización de la 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) para el marcaje de *T. vaginalis* en ensayos de adhesión lo que permitió estudiar la citoadhesión sin necesidad de utilizar isótopos radiactivos (Rojas *et al.*, 2004b). Se demostró que la BrdU se incorpora a *T. vaginalis* y permite la detección y cuantificación de los parásitos que permanecen adheridos a la monocapa de las células HeLa (línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical) mediante la realización de un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) cuantitativo. El método de la BrdU mostró una correlación de 0,97 con respecto al método de marcaje radiactivo con [<sup>3</sup>H]-timidina (Rojas *et al.*, 2004b).

Alderete *et al.* (1998), demostraron que el parásito reconoce y se une a las células HeLa, de un modo similar o idéntico al que se ha descrito con cultivos primarios de CEV (Alderete *et al.*, 1998). Desde entonces, el modelo de la unión de *T. vaginalis* a las células HeLa ha sido ampliamente utilizada por los investigadores y permite conocer y profundizar en los mecanismos de unión del parásito a las células hospederas.

La comparación de los resultados de la citoadherencia de los aislamientos del parásito con las manifestaciones clínicas de las pacientes es controversial. Alderete *et al.* (1998) no encontraron correlación entre la adhesión de los parásitos a las CEV, 8 de las 60 pacientes analizadas presentaban leucorrea o inflamación pélvica. Estos ensayos se llevaron a cabo al contar los parásitos unidos a las CEV por campos microscópicos, lo cual resulta poco confiable por el grado de subjetividad que incluye esta forma de conteo visual de los parásitos adheridos a CEV (Alderete *et al.*, 1998).

De igual modo, Krieger *et al.* (1990b) tampoco detectaron interrelación entre el grado de adhesión de los parásitos y las manifestaciones clínicas, mediante el empleo de parásitos marcados con S-metionina y células HeLa como modelo de CEV (Krieger *et al.*, 1990b). En este trabajo, solo se valoraron como síntomas clínicos, la presencia de leucorrea o de eritema en un pequeño número de aislamientos.

Sin embargo, Gilber *et al.* (2000) demostraron que los aislamientos de *T. vaginalis* provenientes de pacientes asintomáticos o con vaginitis fueron capaces de destruir las CEV. Ellos consideraron que en mayor o menor grado esta acción es favorecida no solo por una producción diferencial de las adhesinas sino también por la presencia en los parásitos de otros factores que pudieran modular los eventos de reconocimiento, adhesión y lisis de las células (Gilber *et al.*, 2000).

En experimentos realizados al utilizar el método de la BrdU se encontró una correlación estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre la adherencia de los aislamientos del parásito a las células HeLa, y las manifestaciones clínicas de las pacientes, se analizó las

manifestaciones clínicas como un todo, cada paciente presentaba varios síntomas y signos a la vez, todos compatibles con una infección por *T. vaginalis* (Rojas *et al.*, 2004b).

Estos resultados confirmaron que la adhesión de los parásitos a las células HeLa constituyen una medida del grado de virulencia y refleja lo que ocurre en la paciente con trichomoniasis y sugiere que el amplio espectro en la sintomatología puede deberse a factores intrínsecos del parásito, sin dejar de tomar en cuenta factores del hospedero, como los que se relacionan con su inmunidad.

### **2.6.2. Hemólisis**

La actividad hemolítica es otro de los mecanismos contacto dependiente que posee *T. vaginalis* (Dailey *et al.*, 1990; Fiori *et al.*, 1993). La mucosa vaginal constituye un entorno nutricional pobre para el parásito. Los lípidos y el hierro son importantes nutrientes para *T. vaginalis* y se pueden adquirir por la vía de lisis de los eritrocitos (Levi *et al.*, 1996). Aunque no está bien definido el por qué y cómo ocurre la hemólisis, se sugiere que la membrana del hematíe, que es rica en colesterol, puede servir de nutriente para el parásito y para que tenga lugar la hemólisis se requieren al menos cuatro pasos: adhesión del parásito a los hematíes, liberación de proteínas formadoras de poros (posiblemente cisteíno-proteasas), separación del parásito y lisis del hematíe (Petrin *et al.*, 1998).

La actividad hemolítica de *T. vaginalis* es importante para la nutrición del parásito, lo que explicaría en parte el por qué durante la menstruación se observa un aumento de la intensidad de las manifestaciones clínicas de la infección. Ensayos realizados por Krieger *et al.* (1983) demostraron que la actividad hemolítica muestra cierta correlación con la virulencia (Krieger *et al.*, 1983)

### **2.6.3. Proteinasa**

Se han aislado entre 11 y 23 cisteino-proteinasa de *T. vaginalis* (Garber y Lemchuk-Favel, 1994; Provenzano y Alderete, 1995). Estas proteinasas juegan un papel importante en la patogénesis y supervivencia de este parásito (Irvine *et al.*, 1997).

Las cisteíno-proteinasas participan como factor lítico en la hemólisis de eritrocitos, en la degradación de inmunoglobulinas G, M y A (IgG, IgM e IgA) presentes en la vagina y en la adhesión del parásito a células epiteliales (Provenzano y Alderete, 1995; Yadav *et al.*, 2007). Se demostró que el pre-tratamiento de *Trichomonas* con N $\alpha$ -p-tosil-lisina clorometilcetona HCl (TLCK), un inhibidor potente de la cisteíno-proteinasas, causa una considerable disminución en su capacidad de adherirse a las células epiteliales. Además, con la adición de las cisteíno-proteinasas a células tratadas con TLCK se recupera la capacidad de adhesión de estas células, lo que indica que la acción de las proteinasas sobre la superficie del parásito es un pre-requisito en el proceso de adhesión celular (Arroyo y Alderete, 1989).

En 1994, Garber y Lemchuk-Favel purificaron y caracterizaron proteinasas de excreción - secreción de *T. vaginalis* de 23, 30, 40 y 60 kDa, al utilizar como sustrato “hide powder azure” y caseína para la medición de la actividad proteínica. Estos autores, sugirieron que en trabajos posteriores debería demostrarse la importancia que pudiera tener la proteínica de 60 kDa en la patogénesis de la enfermedad, así como lo útil que podría resultar para el diagnóstico de esta parasitosis (Garber y Lemchuk-Favel, 1994).

Recientemente, estudios realizados por Hernández *et al.* (2011) sugieren que la proteínica de 62 kDa es un importante factor de virulencia, al encontrar una mayor cantidad de enzimas en el grupo de pacientes sintomáticas en comparación con las asintomáticas (Hernández *et al.*, 2011).

#### **2.6.4. Mecanismos de patogenicidad independientes del contacto**

En relación con los mecanismos de contacto independientes, Garber *et al.* (1989), describieron una sustancia soluble denominada CDF, que al ponerse en contacto con monocapas de células en cultivo “*in vitro*” provoca el desprendimiento de estas células en cultivo (Garber *et al.*, 1989). Esta sustancia parece ser una glicoproteína y es inmunogénica en el hombre. Su papel patógeno no se conoce, pero podría ser responsable de la producción del eritema visto en la mucosa vaginal durante la infección aguda. En otra comunicación, Garber y Lemchuk-Favel (1990) refieren que los niveles de CDF se correlacionan de forma directamente proporcional con la severidad de los síntomas clínicos producidos en el curso de la trichomoniasis, por lo

que se considera que puede ser un importante marcador de virulencia de esta parasitosis (Garber y Lemchuk-Favel, 1990).

La concentración de CDF puede variar por tres factores fundamentales: el tiempo en que se demoran en crecer los parásitos antes de la preparación del filtrado, el tamaño inicial del inóculo, y el pH del medio. El CDF purificado es activo en un rango de pH entre 5,0 - 8,5 con una actividad óptima a pH 6,5 e inactivo por debajo de 4,5. Esta observación es muy importante desde el punto de vista clínico pues como es conocido el pH normal de la vagina es de 4,5, pero durante la trichomoniasis puede elevarse por encima de 5,0 lo cual sugiere que el CDF puede constituir un importante factor en la patogénesis de la enfermedad (Garber *et al.*, 1989).

El factor de desprendimiento celular disminuye su actividad con el beta estradiol. Los síntomas de la infección pueden estar influenciados por la concentración vaginal de estrógenos. Esto puede explicar el empeoramiento de los síntomas durante la menstruación, cuando los niveles de estrógenos son más bajos (Garber *et al.*, 1991).

#### **2.6.5. Interacción con la microbiota vaginal**

La interacción de *T. vaginalis* con los miembros de la microbiota residentes en la vagina puede ser un factor importante para evadir el sistema inmune del hospedero.

La microbiota vaginal humana está condicionada por la presencia del bacilo de *Doderlein*. Este actúa sobre la glucosa 6-fosfato proveniente del glucógeno liberado por la citólisis de las células intermedias, en dependencia de la producción del nivel de estrógeno circulante. *T. vaginalis* sustrae el glucógeno de las células epiteliales, por tanto, los bacilos de *Doderlein* (que se alimenta de glucógeno transformándolo en ácido láctico) disminuyen y el pH vaginal normal, que oscila entre 3,8 a 4,5 se alcaliniza favoreciéndose el desarrollo del parásito y de otros gérmenes patógenos (Petrin *et al.*, 1998).

La elevación del pH de la vagina, conjuntamente con la reducción de *Lactobacillus acidophilus* y el incremento en la producción de las bacterias anaeróbicas, son un marcador de

la enfermedad. Cuando las bacterias anaerobias aparecen “in vitro” con un pH controlado, los *lactobacilos* no afectan el crecimiento de *T. vaginalis*. Sin embargo, parece que el parásito tiene un efecto supresivo sobre el *L. acidophilus* (Mc Grory *et al.*, 1994). Varios mecanismos se proponen. Uno plantea que las *T. vaginalis* fagocitan bacterias y *lactobacilos* (Rendon-Maldonado *et al.*, 1998). Otra hipótesis plantea que las proteinasas secretadas por el parásito son capaces de destruir a los *lactobacilos* (McGrory y Garber, 1992).

#### **2.6.6. Evasión de la respuesta inmune**

La respuesta inmune celular y humoral son evidentes en pacientes con trichomoniasis. No obstante, es solo parcialmente protectora (Petrin *et al.*, 1998; Harp y Chowdhury, 2011). En condiciones medio ambientales hostiles, las *T. vaginalis* pueden sobrevivir gracias a la capacidad de poder evadir la respuesta inmune del hospedero, lo cual se considera como un importante aspecto relacionado con la patogénesis. La invalidación del complemento es una estrategia usada por *T. vaginalis*. La resistencia al complemento al degradar la porción C3 es dependiente de concentraciones elevadas de hierro donde se involucran las cisteíno proteinasas del parásito (Alderete *et al.*, 1995).

Como mecanismo de evasión de la respuesta inmune, *T. vaginalis* puede desplegar una variación fenotípica. En relación a este planteamiento se encontraron dos clases de marcadores que se expresan de forma alternativa en la superficie del parásito. Ellos son: la proteína altamente inmunogénica P270 y las adhesinas AP23, AP33, AP65 y AP51 (Alderete *et al.*, 1992). Mientras todos los aislamientos sintetizan la proteína P270, solo algunos organismos pueden sufrir variación fenotípica entre la expresión de la glicoproteína P270 de la superficie de las células y la citoplasmática. Así, los fenotipos se describen como A+ B- (P270 positivo) y A-B+ (P270 negativo) (Alderete, 1988). A los organismos de fenotipo positivo les faltan las adhesinas y no pueden citoadherirse o parasitar células del hospedero, solo los organismos del fenotipo negativo tienen la capacidad de citoadherencia. Se plantea que después de un tiempo prolongado “in vitro”, los parásitos cambian la citoadhesión hacia el fenotipo positivo (Alderete, 1988).

En ensayos “in vitro”, se ha demostrado que algunos organismos que presentan el antígeno P270 en la superficie de la célula son susceptibles a la lisis independiente del complemento mediada por anticuerpos. La falta de expresión de la proteína P270 de superficie y la naturaleza inmunorecesiva de la adhesinas permiten a los organismos del fenotipo negativo sobrevivir al ataque de los anticuerpos (Musatovova y Alderete, 1998). Las adhesinas parecen poder imitar la estructura de la enzima málica de las células vaginales, lo que parece ser la causa de su baja inmunogenicidad (Alderete *et al.*, 1995; Engbring *et al.*, 1996). Esta imitación molecular es otro ejemplo de cómo *T.vaginalis* puede escapar al sistema inmune del hospedero (Engbring *et al.*, 1996).

P230, es otro inmunógeno que está presente en la superficie del parásito, el cual produce cambios conformacionales que le permiten evadir a los anticuerpos (Alderete, 1988). La IgG vaginal que reconoce la proteína P230 de *T. vaginalis*, no produce ningún efecto citolítico, incluso en presencia del complemento (Alderete *et al.*, 1991). Además, la respuesta del anticuerpo se restringió solamente a uno o varios epítopes de la proteína de 230 kDa, lo que permite al organismo evadir el proceso de opsonización (Alderete *et al.*, 1991).

Numerosas cisteíno proteinasas secretadas por *T.vaginalis* degradan IgG, IgM e IgA, lo cual también le permite al parásito sobrevivir a la respuesta inmune (Provenzano y Alderete, 1995; Yadav *et al.*, 2007).

Este parásito también secreta grandes cantidades de antígenos solubles, altamente inmunogénicos (Alderete y Garza, 1984). Una liberación continua de estos antígenos podría neutralizar linfocitos T citotóxicos o anticuerpos y de esta manera bloquear los mecanismos de defensa específicos del sistema inmune contra *T. vaginalis*. Otro mecanismo de evasión del parásito consiste en cubrirse con proteínas del plasma del hospedero, lo que le impide al sistema inmune reconocerlo como extraño (Peterson y Alderete, 1982).

Chang *et al.* (2006) demostraron además que *T. vaginalis* induce la apoptosis de macrófagos, mediante la activación de la proteína quinasa p38 en estas células efectoras, lo que constituye

un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del ataque de macrófagos (Chang *et al.*, 2006).

### **2.6.7. Virus de *T. vaginalis* (VTVs)**

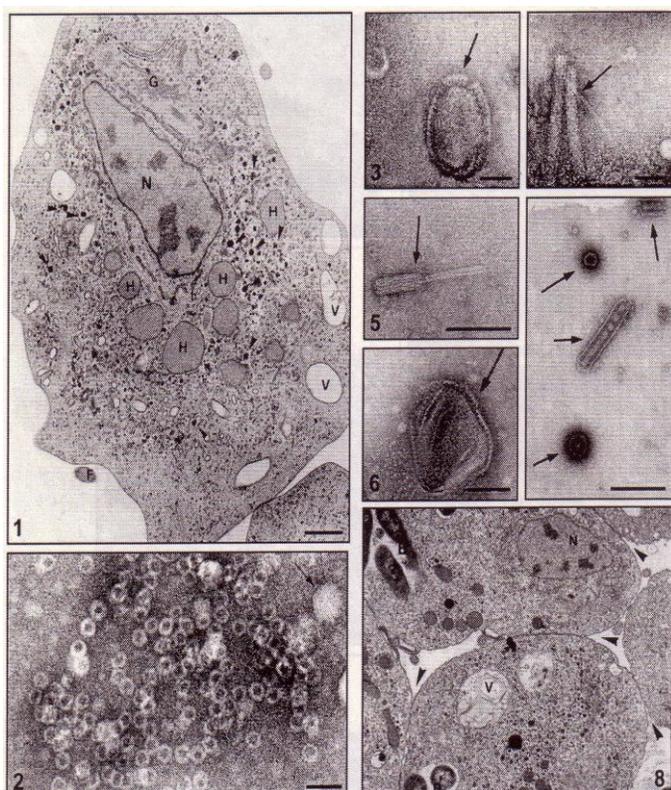
En 1985, Wang y Wang detectaron por técnicas de Biología Molecular, moléculas de ácidos nucleicos de aproximadamente 5,5 kb en extractos de ácidos nucleicos de la cepa de referencia de *T. vaginalis* ATCC 30001. Estas moléculas mostraron resistencia a la acción de enzimas tales como ADNasa I, ADN polimerasa I, enzimas de restricción que utilizan ADN como sustrato y bleomicina A2, la cual degrada el ADN de doble cadena. En contraste, esta molécula se degradó totalmente con el tratamiento con NaOH 0,2 M, ARNasa T y ARNasa A, lo que sugirió la naturaleza de esta molécula como ARN (Wang y Wang, 1985).

La sensibilidad de la molécula a la ARNasa dependiente de la fuerza iónica, donde a baja fuerza iónica se degrada rápidamente, unido con la hiperionidad y la densidad con respecto al ADN, permitió llegar a la conclusión de que la naturaleza de esta molécula era ARN de doble cadena. Al examinar el ARNdc mediante el microscopio electrónico, se reveló una doble hélice lineal de 1,5  $\mu\text{m}$  de longitud, que se desnaturaliza con calor o con dimetil sulfóxido (DMSO) al 30 % y se originan cadenas simples de igual longitud (Wang y Wang, 1985).

La estabilidad de los ARNdc en homogenados crudos de *T. vaginalis*, bajo condiciones en las que otros ácidos nucleicos son degradados por nucleasas endógenas, evidenciaron que ARNdc de 5,5 kb forman parte de una partícula semejante a virus. Estos se denominaron virus de *T. vaginalis* (VTVs) y constituyen el primer virus identificado y purificado a partir de protozoos (Wang *et al.*, 1987; Wang y Wang, 1991).

Para investigar la prevalencia de la infección viral Wang *et al.* (1987) analizaron aislamientos frescos del parásito. De los 28 aislamientos analizados 14 contenían los VTVs, mientras que el resto estaban libres de virus. Ocho de los 14 aislamientos positivos a virus perdían su ARNdc después de pases “in vitro” durante varios meses (Wang *et al.*, 1987).

Un mismo parásito puede estar infectado con diferentes VTVs al mismo tiempo, estos virus se encuentran en el citoplasma del parásito cercanos al Complejo de Golgi o adyacentes a la membrana plasmática, tienen un tamaño variable entre 33- 200 nm, presentan diferentes formas (cilíndricas, filamentosas y esféricas) (Figura 4) (Benchimol *et al.*, 2002). La talla genómica de su ARNdc varía entre 4,3 y 4,8 kpb, pudiéndose encontrar co-infecciones con ARNdc pequeños de 0,5 kpb (Khoshnan y Alderete, 1993; Tai e Ip, 1995). Recientemente, Goodman *et al.* (2011a) informaron cuatro aislamientos clínicos establemente infectados con 1, 2 o 4 VTVs distintos (Goodman *et al.*, 2011a).



**Figura 4. (1) Vista general del parásito que contiene VTVs (aislamiento JT). Se muestra la distribución de organelos: hidrogenosomas (H), núcleo (N), vacuola (V), flagelo (F); x 15000 bar= 650 nm. (2-7). Ultraestructura de distintos VTVs. Microfotografía electrónica de muestras de aislamiento 347+ obtenido por centrifugación diferencial con CICs. (2) la población se forma de 33 nm mientras que 3-7 el tamaño de los virus varía de 33 a 200 nm. Segmento 2, bar= 100 nm, 3-7 bar= 50 nm. (8) *T. vaginalis* aislamiento 347- después de 1 h de interacción con VTVs. Tomado de: Benchimol *et al.*, 2002**

La prevalencia de VTVs en diferentes aislamientos clínicos varia. Valores tan altos como 82 y 75 % se han informado en aislamientos clínicos de Sudáfrica (Weber *et al.*, 2003) y Baltimore, Estados Unidos (Wendel *et al.*, 2002), respectivamente, sin embargo valores cercanos al 50% se han notificado en Estados Unidos (50 %) (Snipes *et al.*, 2000) y en diferentes regiones geográficas (44%) (Vanáčová *et al.*, 1997; Hampl *et al.*, 2001b). Recientemente Conrad *et al.* (2012) al analizar 130 aislamientos provenientes de diferentes orígenes geográficos (Puerto

Rico, Inglaterra, Taiwán, Estados Unidos, Italia, Mozambique, Sudáfrica y Australia) informaron una prevalencia de 40,7 % (Conrad *et al.*, 2012).

La organización genómica y la diversidad genética, identifican a los VTVs como miembros legítimos de la familia *Totiviridae* (Wang *et al.*, 1993). La familia *Totiviridae*, comprende un amplio rango de virus, caracterizados por viriones isométricos en un rango de 30 a 40 nm de diámetro, en los que cada uno contiene genomas no segmentados de ARNdc con solapamiento de los marcos abiertos de lectura que codifican la proteína de la cápside (CP, siglas en inglés capside protein) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, siglas en inglés RNA-dependent RNA polymerase) (Ghabrial, 2008). Estrategias diferentes de expresión de la RdRp aparecen dentro de los miembros de esta familia. Los virus que infectan los protozoos parásitos y *Sacharomyces cerevisiae*, usan la fusión con CP consecuente con una corrida del marco de lectura ribosomal “ribosomal frameshifting” (Diamond *et al.*, 1989; Icho y Wickner 1989).

Actualmente dentro de la familia *Totiviridae*, se reconocen cuatro géneros: *Giardiavirus*, *Leishmanivirus*, *Totivirus* y *Victorivirus* (Ghabrial, 2008). Los VTVs se agrupan como un miembro tentativo dentro del género *Giardiavirus* como una sub-especie (Catalogue of Life, 2007). Estudios de secuenciación viral y filogenia sugieren que los VTVs no están cercanamente relacionados con *Giardiavirus* como para garantizar su posición dentro del mismo género (Bessarab *et al.*, 2011; Goodman *et al.*, 2011a,b).

Recientemente, la diversidad genética y otras características distintivas de los VTVs, han hecho proponer a estos virus como un nuevo género, denominado *Trichomonasvirus* (Goodman *et al.*, 2011b). Se describen cuatro especies de VTVs, denominadas VTV-1, 2, 3 y 4, las que se identificaron a partir de la comparación de genomas y análisis filogenético (Goodman *et al.*, 2011a,b). De forma general muy pocos aislamientos de VTVs se han secuenciado y caracterizado, de ahí la necesidad de secuenciar otros genomas de diferentes orígenes geográficos y continuar los estudios relacionados con el análisis filogenético de estos VTVs y en especial donde se involucre la mayor cantidad de aislamientos de VTVs secuenciados junto con la mayor cantidad de especies del resto de los géneros de la familia

*Totiviridae*. De estos resultados depende la ratificación del Comité Ejecutivo del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV) de la propuesta de Goodman *et al.* (2011b) de que los VTVs pertenezcan a un nuevo género dentro de la familia *Totiviridae* (Goodman *et al.*, 2011b).

Hoy no se conoce si los VTVs son habitantes naturales de las *T. vaginalis* o si son adquiridos del hospedero en el que el protozoo reside (Pindak *et al.*, 1989). No hay elementos hasta el momento que determinen si los VTVs son capaces de tener la maquinaria molecular para entrar o salir del protozoo o simplemente son transmitidos verticalmente durante la división celular mitótica que ocurre durante la reproducción asexual de los trofozoitos por fusión binaria y por ende sean habitantes naturales de los parásitos (Schewebke y Burgess, 2004). Sin embargo, la presencia de aislamientos infectados con virus y otros no infectados además de los informes que después de sucesivos pases "in vitro" durante un prolongado período de tiempo los VTVs pueden perderse (Wang *et al.*, 1987; Shaio *et al.*, 1993), constituyen elementos que hablan a favor de la entrada de los virus del hospedero donde el parásito reside, a partir de características propias del parásito.

Escasos estudios han tratado de asociar el polimorfismo genético de los aislamientos con la presencia de VTVs (Vanáčová *et al.*, 1996; Hampl *et al.*, 2001b; Snipes *et al.*, 2000; Hussein *et al.*, 2005; Conrad *et al.*, 2012) y solo dos estudios han encontrado asociación al utilizar las técnicas de RAPD y microsatélites para evaluar la variabilidad genética (Snipes *et al.*, 2000; Conrad *et al.*, 2012). Estos hallazgos sugieren que la infección de los mismos pudiera estar determinada por características propias del parásito, y de esta manera especular de algunas formas de entrada al parásito. Sin embargo otros estudios se necesitan para corroborar estos hallazgos.

La presencia de los VTVs en los aislamientos del parásito juegan un papel importante en la expresión de proteínas que intervienen en la patogenia de la enfermedad, tal es el caso de la expresión de la glicoproteína P270 (Khoshnan y Alderete, 1994) y la expresión diferencial cualitativa y cuantitativa de cisteíno-proteinasas, que participan en la citoadherencia al epitelio vaginal, citotoxicidad y degradación de los componentes de membrana (Provenzano *et al.*,

1997). De ahí que se plantee que los VTVs inducen varios cambios fenotípicos que pueden tener un impacto en la virulencia de *T. vaginalis* (Wang *et al.*, 1987; Provenzano *et al.*, 1997). A pesar de estos estudios, el papel de los VTVs en la patogénesis de la trichomoniasis queda aún por determinar (Sood y Kapil, 2008). La presencia o ausencia de virus ARNdc definen dos tipos naturales de aislamientos de *T. vaginalis* (Wang y Wang, 1986). Los aislamientos sin VTVs se denominan tipo I mientras que los aislamientos positivos a VTVs, constituyen el tipo II (Gillin y Sher, 1991).

Los aislamientos tipo I constituyen una población homogénea del parásito que sintetiza la glicoproteína P270, pero no son capaces de expresarla a la superficie. Los aislamientos tipo II, por su parte, incluyen una población heterogénea de trichomonas donde se presentan variaciones fenotípicas entre la expresión de superficie y citoplasmática de la glicoproteína P270 (Alderete *et al.*, 1986; Alderete *et al.*, 1987). La pérdida de VTVs de los parásitos tipo II resulta en una transición de trichomonas al tipo I (Alderete *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1987), lo que demuestra que estos virus influyen en la expresión superficial de la glicoproteína P270 (Khoshnan y Alderete, 1994).

Mientras que algunos informes sugieren que la infección de *T. vaginalis* con VTVs resulta en una atenuación de la citopatogenicidad y respuesta inflamatoria aguda (Kim *et al.*, 2007), otros sugieren la posibilidad de la hipervirulencia al observar la expresión de la glicoproteína P270 en membrana (Alderete *et al.*, 1986) y la expresión de proteinasas extracelulares (Provenzano *et al.*, 1997). Wendel *et al.* (2002), informaron por primera vez la prevalencia de VTVs, y para ello tuvieron en cuenta la edad y el sexo. Además asociaron por primera vez las manifestaciones clínicas presentadas en las pacientes con trichomoniasis con la presencia o ausencia de VTVs en aislamientos clínicos de *T. vaginalis*. Estos autores plantearon que los aislamientos positivos a virus tienen una mayor prevalencia en mujeres que en hombres, así como los pacientes con aislamientos positivos a virus son de mayor edad que los pacientes con aislamientos negativos a virus (edad promedio 38 vs 23 años  $P= 0,003$ ) lo que resultó estadísticamente significativo. A pesar de esto, no se encontró asociación entre la presencia o ausencia de virus en los aislamientos de parásitos y los síntomas de los pacientes (Wendel *et al.*, 2002). De igual modo, en la India, Malla *et al.* (2011), al analizar la presencia de VTVs en

30 aislamientos procedentes de pacientes sintomáticas (15 aislamientos) y asintomáticas (15 aislamientos) no encontraron asociación entre la presencia de VTVs y las manifestaciones clínicas, ni tampoco con la resistencia al metronidazol (Malla *et al.*, 2011).

Estos resultados evidencian la necesidad de profundizar en el estudio de la relación entre las manifestaciones clínicas de la trichomoniasis y la infección viral de las *Trichomonas*. Así como su asociación con otros factores biológicos del parásito entre ellos la citoadhesión lo que ayudaría a esclarecer si la presencia de VTVs altera la virulencia de *T. vaginalis*, elemento que no ha sido explorado hasta el momento (Wendel *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003).

### **2.7. Métodos utilizados para evaluar la variabilidad genética entre aislamientos de *T. vaginalis***

Poco es conocido sobre el grado de variación genética entre los aislamientos de *T. vaginalis*, así como su influencia en la presentación de diferentes fenotipos, que inducen diferentes manifestaciones clínicas o muestran resistencia al metronidazol. Los estudios sobre la asociación entre la variación genética y diferentes fenotipos clínicos y biológicos podrían ayudar a dilucidar los mecanismos de patogenicidad de la trichomoniasis (Petrin *et al.*, 1998).

La técnica más clásica utilizada para analizar la diversidad genética, emplea el polimorfismo de una variedad de enzimas conocidas o en general de las proteínas (antígenos o enzimas) que se pueden relacionar con una característica genética. Con el desarrollo del análisis de las aloenzimas, a mediados de los años 60, se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de diferentes orígenes geográficos.

La caracterización aloenzimática, se utilizó para estudiar el polimorfismo genético entre aislamientos de *T. vaginalis*, y demostró la variabilidad genética con el uso de enzimas: lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, hexoquinasa, enzima málica y glucosa fosfato isomerasa (Proctor *et al.*, 1988; Vohra *et al.*, 1991; Yuan y Gao, 2003). Aún cuando la metodología del análisis de las aloenzimas es simple y barata, el número de loci enzima/proteína polimórfico tiende a ser limitado en número y cantidad de la variabilidad, lo

cual, unido al hecho de que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distintiva de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época de año a otra, hace que no sea capaz de detectar suficiente polimorfismo entre especies cercanas e incluso dentro de una misma especie (D'Surney *et al.*, 2001).

Los avances de la tecnología del ADN recombinante, permitieron el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, y muestran la estabilidad en la identificación de especies y variedades. Estos remplazan el análisis de proteínas.

La caracterización molecular de cepas y/o aislamientos consiste en utilizar métodos genéticos para estudiar el ADN de un organismo en cuestión. Constituye un elemento importante en los estudios epidemiológicos para detectar la variabilidad genética o el polimorfismo entre individuos o cepas de una misma especie o diferentes especies, lo que permite encontrar marcadores genéticos de diagnóstico, virulencia y patogenicidad. Con estos marcadores se determina el papel del polimorfismo en la interacción hospedero-parásito y parásito-vector y se aporta al conocimiento de la patogenia de una enfermedad (D'Surney *et al.*, 2001; Rosenthal, 2001).

Diferentes métodos genéticos se han utilizado para demostrar el polimorfismo genético entre aislamientos de *T. vaginalis* en los que se incluyen: la técnica de hibridación molecular con la sonda Tv-E650-7 (Pace *et al.*, 1992; Ryu *et al.*, 1998), la técnica del polimorfismo de las longitudes de los fragmentos de restricción (RFLP) al utilizar como sonda el gen *hsp70* (Stiles *et al.*, 2000; Meade *et al.*, 2009; Cornelius *et al.*, 2010), el análisis de microsatélites (Conrad *et al.*, 2011; Prokopi *et al.*, 2011; Conrad *et al.*, 2012), la secuenciación del gen ribosomal 5.8S (Snipes *et al.*, 2000), la tipificación por secuencias de multilocus (MLST, siglas en inglés Multilocus sequence typing) (Cornelious *et al.*, 2012) y la técnica del RAPD (Vanáčová *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 2000; Hampl *et al.*, 2001a,b; Yuan y Gao, 2004; Kaul *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2004a; Xiao *et al.*, 2006; 2008; Valadkhani *et al.*, 2011; Muzny *et al.*, 2012). Esta última ofrece ventajas para la caracterización genética de aislamientos al no necesitar información de la secuencia del ADN y constituye una técnica más rápida y sensible si se compara con otros

métodos moleculares empleados en la caracterización genómica (Van Belkum *et al.*, 1993; Papp *et al.*, 1997; Lin, 1998).

### **2.7.1. Técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)**

La técnica del RAPD desarrollada por Williams *et al.* (1990), es un ensayo basado en la amplificación de segmentos de ADN al azar y utiliza cebadores de secuencias arbitrarias (Williams *et al.*, 1990). El ADN genómico se somete a amplificación, mediante uno o múltiples cebadores cortos, los que se unen a muchas regiones del genoma de forma simultánea, pero la amplificación solo ocurrirá en las regiones en las que el extremo 3' del cebador se une al ADN y se enfrenta a otro que no esté alejado a más de 3 kpb. Estas condiciones sugieren que los sitios de unión de los cebadores deben estar en regiones invertidas. Los RAPDs amplifican entonces segmentos de ADN repetitivos en el genoma, pero también regiones únicas, y se amplifican secuencias de ADN de tamaño variable, de ahí que el polimorfismo entre individuos o cepas sea detectado por diferencias entre los patrones de fragmentos de ADN amplificados, con un cebador dado. Para llevar a cabo un experimento de RAPD, no es necesario tener conocimientos de secuencias genéticas, tampoco es necesario disponer de grandes cantidades de ADN, ni utilizar sondas, ni hibridación y el protocolo es relativamente rápido y sencillo (Williams *et al.*, 1990).

El producto de la RCP con cebadores arbitrarios usualmente se analiza por electroforesis en gel de agarosa coloreado con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta o en geles de poliacrilamida visualizado con plata (Welsh y Mc Clelland, 1990; Steindel *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 1995). Los productos de la amplificación considerados como firmas o huellas digitales del ADN molde que se analiza son detectados como un complejo de multibandas y patrones hipervariables resultado de sitios desiguales de unión y longitudes variables de la secuencia intermedia de amplificación (Welsh y Mc Clelland, 1990; Caetano-Anolles, 1991).

Aunque se han desarrollado alternativas automáticas y sistemas computarizados para el análisis de los datos del RAPD los resultados se analizan visualmente según la observación de las bandas obtenidas en la fotografía del gel. Se introducen los datos de cada línea o senda de forma manual a programas de computación, los cuales al utilizar un determinado coeficiente

de similitud, generan una matriz de similitud genética que finalmente se analiza por un método de distancia, que da como resultado un árbol filogenético (dendograma), que es una gráfica que ilustra las relaciones filogenéticas entre un grupo de organismos o genes.

La técnica del RAPD, es una herramienta con la capacidad de detectar regiones altamente variables en el ADN a partir de un método rápido, tiene una gran importancia en las investigaciones biomédicas, la detección de varios tipos de mutaciones en el ADN, la caracterización de aislamientos, el mapeo de genes, el estudio de poblaciones, la identificación de cepas, estudios epidemiológicos y taxonómicos, así como en el análisis de rasgos simples y complejos del fenotipo como es el fenómeno de la resistencia (Ellsworth *et al.*, 1993; Carlton *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1996; Bardakci, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2003; Pelayo *et al.*, 2003, Fernández- Calienes *et al.*, 2004, Fraga *et al.*, 2011).

Sin embargo, diferentes estudios demuestran que varios factores afectan los perfiles de RAPDs obtenidos, lo que se manifiesta en la presencia de bandas falsas y la poca reproducibilidad del ensayo (Welsh y McClelland, 1990; Bassam *et al.*, 1992; Ellsworth *et al.*, 1993; Muralidharan y Wakeland, 1993; Micheli *et al.*, 1994; Atienzar *et al.*, 2000; Diakou y Dovas, 2001), por lo que la optimización y el control interno de la técnica se hacen imprescindibles para obtener resultados confiables, reproducibles y una resolución consecuente entre reacciones de amplificación separadas o entre los diferentes estudios (Ellsworth *et al.*, 1993; Bardakci, 2001). En este sentido para evaluar el polimorfismo genético de los aislamientos de *T. vaginalis* en nuestro laboratorio, fue normalizada la técnica de RAPD por Fraga *et al.*, (2002), con lo que se obtuvieron resultados confiables y reproducibles al analizar aislamientos del parásito (Fraga *et al.*, 2002).

### **2.7.2. Análisis del polimorfismo genético entre aislamientos de *T. vaginalis* mediante la técnica de RAPD. Su relación con fenotipos clínicos y biológicos**

La técnica del RAPD ha sido utilizada en investigaciones epidemiológicas y en estudios donde no solo se demostró el polimorfismo genético entre aislamientos de *T. vaginalis*, sino también se relacionó este polimorfismo genético con diferentes fenotipos clínicos y biológicos en aislamientos de este parásito (Vanáčová *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 2000; Hampl *et al.*,

2001a,b; Kaul *et al.*, 2004; Yuan y Gao, 2004; Xiao *et al.*, 2006; 2008; Valadkhani *et al.*, 2011).

Vanáčová *et al.* (1997) fueron los primeros investigadores en utilizar la técnica del RAPD en estudios genéticos de las *Trichomonas*, y probaron la utilidad del mismo en estudios epidemiológicos y filogenéticos. El análisis intraespecie de 18 aislamientos de *T. vaginalis* sugirió una relación genética entre aislamientos, asociados según su origen geográfico y la resistencia al metronidazol. Se encontró además una correlación con la severidad de la enfermedad observada en las pacientes, pero no con los resultados de los ensayos de virulencia “in vivo” realizados en el laboratorio, ni con la infección de aislamientos del parásito con VTVs (Vanáčová *et al.*, 1997).

En otro estudio, Snipes *et al.* (2000), emplearon la misma técnica e investigaron el polimorfismo genético mediante el análisis de RAPD entre 109 aislamientos de *T. vaginalis*, y encontraron una correlación entre la variabilidad genética de los aislamientos y la resistencia al metronidazol. Estos autores además, encontraron que los aislamientos infectados con VTVs, estaban relacionados entre ellos y separados del resto de la población. Mientras que al analizar las manifestaciones clínicas de 29 pacientes, donde se tuvo en cuenta el número de síntomas presentes, no se encontró correlación entre las manifestaciones clínicas y la presencia de VTVs, la resistencia al metronidazol ni las relaciones genéticas basadas en el análisis por RAPD (Snipes *et al.*, 2000).

Hampl *et al.* (2001b), al estudiar el polimorfismo genético entre 10 aislamientos de *T. vaginalis* mediante la técnica del RAPD, encontraron una correlación entre el polimorfismo genético y la presencia de *Mycoplasma* y la susceptibilidad al metronidazol. Pero, no encontraron relación con el origen geográfico de los aislamientos, la infección de estos aislamientos con VTVs, la clínica de las pacientes, ni con la virulencia aún después de abordada al utilizar diferentes métodos “in vivo” (Hampl *et al.*, 2001b).

Kaul *et al.* (2004), examinaron la posibilidad de diferenciar aislamientos sintomáticos de aislamientos asintomáticos de *T. vaginalis* mediante la técnica del RAPD al utilizar 5

cebadores al azar. Ellos observaron que los aislamientos sintomáticos aparecían agrupados dentro de dos grupos distintos, donde uno de los cuales se separa claramente de los aislamientos asintomáticos (Kaul *et al.*, 2004).

Xiao *et al.* (2006; 2008) por su parte, analizaron el polimorfismo genético de 28 aislamientos de *T. vaginalis* procedentes de China y encontraron una asociación entre el polimorfismo genético y la resistencia de los aislamientos al metronidazol y la presencia de *Mycoplasma*, estadísticamente significativa. Se demostró posteriormente que la presencia de *M. hominis* en aislamientos de *T. vaginalis* variaba significativamente el perfil de bandas encontradas mediante la técnica del RAPD; y por consiguiente en la interpretación de los datos, de ahí la necesidad de demostrar que los aislamientos a analizar estén libres de *Mycoplasma*, antes de estudiar con rigor el polimorfismo genético y su asociación con las manifestaciones clínicas de las pacientes y características biológicas de los aislamientos (Xiao *et al.*, 2006; 2008).

Recientemente, Valadkhani *et al.* (2011) analizaron el polimorfismo genético mediante la técnica del RAPD con 6 cebadores al azar en 40 aislamientos procedentes de pacientes iraníes sintomáticas y asintomáticas. Estos autores observaron que los aislamientos se distribuían en dos grupos principales filogenéticamente e informaron la presencia de un marcador genético de 1300 pb que está presente en la mayoría de los aislamientos procedentes de mujeres asintomáticas. La diferenciación del polimorfismo genético entre aislamientos sintomáticos y asintomáticos resultó ser estadísticamente significativa (Valadkhani *et al.*, 2011).

Nuestro grupo de trabajo realizó el análisis del polimorfismo genético de 40 aislamientos de *T. vaginalis* procedentes de adolescentes con 10 cebadores diseñados al azar, y obtuvo una correlación entre el polimorfismo genético y las manifestaciones clínicas en las pacientes (Rojas *et al.*, 2004a). A pesar de esto, el bajo número de cebadores utilizados influyó en los resultados de bootstrap de los dendogramas construidos, lo que hace necesario incrementar el número de cebadores al analizar este grupo de aislamientos.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

Los reactivos y métodos comerciales utilizados en la realización de este estudio contaban con el certificado de calidad para análisis y el listado de los mismos junto con su procedencia se especifican en el Anexo 1.

#### 3.2. Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental y descriptivo, en el período de tiempo comprendido entre enero del año 2005 a agosto del año 2011, en los laboratorios del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK).

#### 3.3. Universo de trabajo

El universo de trabajo consistió en 40 aislamientos frescos de *T. vaginalis* que se obtuvieron a partir de exudados vaginales provenientes de adolescentes atendidas en las consultas Infanto-juvenil, de Interrupción de embarazo y de ITS, de los Hospitales Ginecobstétricos “Eusebio Hernández” y “Ramón González Coro” de La Habana en un período entre Junio del año 1999 y Junio del año 2001 (Rojas *et al.*, 2003; 2004a,b). Las pacientes de donde procedían estos aislamientos se encontraban libres de diferentes microorganismos estudiados tales como: infecciones por *Candida spp.*, vaginosis bacteriana, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Papilomavirus* humano y VIH, los que se descartaron mediante la realización de diferentes exámenes ginecológicos y de laboratorio (Rojas *et al.*, 2003; 2004a,b).

Para la realización del exudado vaginal, se utilizó un hisopo estéril, que se aplicó en los fondos de saco uterino y resto de la cavidad vaginal. La muestra se colocó en un tubo de cristal correctamente identificado que contenía 1 mL de solución salina estéril al 0,9 %.

Posteriormente, se centrifugó a 5000 g durante 7 min y se estudió el sedimento entre cubre y portaobjeto para determinar la presencia o no de *T. vaginalis*. Este procedimiento se realizó en los laboratorios de Microbiología de los hospitales donde se tomó la muestra. En todos los casos, la muestra se llevó a los laboratorios de investigaciones de la Vicedirección de Parasitología del IPK, donde 100 µL del sedimento fueron sembrados en el medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978) en tubos de cristal con tapa de rosca y se incubaron a 37 °C suplementado con suero de ternero sin calostro, descomplementado, y antibióticos. Para la axenización se realizaron cambios sucesivos de medio suplementado con antibióticos (50 µg/mL gentamicina, 100 U/mL penicilina, 30 µg/mL estreptomycin) y antimicóticos (60 µg/mL nistatina).

Los precipitados de parásitos con menos de 10 pases después del aislamiento se conservaron debidamente a -20°C en el Departamento de Parasitología del IPK y fue el material parasitario de partida para este estudio.

La aprobación ética para obtener los aislamientos, con los cuales se realizaron los estudios de caracterización biológica, fue aprobado por los Comités de Ética Médica del IPK y los Hospitales Ginecobstétricos. Las pacientes se informaron sobre el estudio y se obtuvo el consentimiento informado firmado por los pacientes y sus padres o tutores.

Los aislamientos se caracterizaron desde el punto de vista clínico, a partir de los síntomas y signos encontrados en las pacientes, clasificados en asintomáticos y sintomáticos leves, moderados y severos (Anexo 2) (Rojas *et al.*, 2003).

### **3.4. Obtención de ácidos nucleicos**

#### **3.4.1. Obtención total de ácidos nucleicos (ADN/ARN)**

Para la extracción total de ácidos nucleicos (ADN, ARN) se utilizó el método de fenol-cloroformo (Maniatis *et al.*, 1990):  $2 \times 10^6$  células de *T. vaginalis* en fase logarítmica del crecimiento “in vitro” se lavaron con solución salina amortiguadora (PBS, siglas en inglés Phosphate buffered saline NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato de sodio dibásico 10 mM,

fosfato de potasio monobásico 2 mM a pH 7,4). Se centrifugó a 8000 g por 10 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió en 300 µL de solución amortiguadora de lisis (tris-HCl 50 mM pH 8,25; EDTA 25 mM, NaCl 25 mM, SDS a 1 %). La mezcla se trató durante 2 h a 56 °C con 100 µg/µL de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania) y seguidamente se realizaron 2 extracciones de proteínas con igual volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24 :1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24 :1) con sus respectivas centrifugaciones a 8000 g por 10 min a 4 °C. El material genético se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,3 durante toda la noche a -20 °C. El precipitado de ácidos nucleicos que se obtuvo por centrifugación a 10000 g durante 20 min, se lavó con etanol a 70 %, para ello se añadió 400 µL de etanol 70 % y por centrifugación a 9000 g durante 10 min se obtuvo el precipitado, el que se secó a temperatura ambiente. Finalmente, después de seco, el precipitado se resuspendió en 50 µL de solución amortiguadora tris-EDTA (TE) (tris-HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). Estos ácidos nucleicos se utilizaron para la detección de ARNdc y para obtener ADN genómico.

### **3.4.2. Detección de ARNdc y ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa**

Se determinó la presencia de los ácidos nucleicos a partir de 10 µL del material obtenido de la extracción total de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en solución amortiguadora tris borato EDTA (TBE 0,5 x) (tris-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M) que contenía bromuro de etidio (0,5 µg/mL). La electroforesis se efectuó en la cámara de electroforesis a un voltaje constante de 80 V durante 2 h con una fuente (Pharmacia LKB Multidrive XL, Suecia). La visualización se realizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador (Macrovue 2011, Pharmacia LKB, Suecia). Se utilizó en la electroforesis el marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (New England Biolabs, Reino Unido).

### **3.4.3. Obtención de ADN genómico**

Para la obtención del ADN genómico, 40 µL del volumen obtenido de la extracción total de ácidos nucleicos se le adicionó 10 µg/mL de ARNasa H (Boehringer Mannheim, Alemania) y se incubó durante 1 h a 37 °C con el propósito de eliminar el ARN presente en la muestra. Seguidamente, se eliminó la enzima ARNasa H y el ARN presente con el empleo de un

volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24 :1) y el sobrenadante correspondiente al ADN genómico se obtuvo por centrifugación a 8000 g por 10 min, el mismo se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los estudios moleculares.

#### **3.4.4. Determinación de la concentración y calidad del ADN genómico**

En todos los casos, la concentración del ADN genómico, se determinó en un espectrofotómetro (Spectrophotometer JASGO V-630, Tokio, Japón) mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm. La cuantificación se realizó a partir del principio de que 1 D.O. 260 nm = 50  $\mu\text{g}$  de ADN doble cadena.

Así:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{50 \times \text{dilución} \times \text{D.O.}_{260 \text{ nm}}}{1000}$$

La lectura se realizó además a 280 nm, longitud de onda a la cual absorben las proteínas. Para determinar la pureza del ADN se utilizó la siguiente relación: D.O. 260 nm / 280 nm en donde la lectura debe estar entre 1,8 – 2,0.

La calidad del proceso de extracción del ADN genómico se determinó igualmente mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en TBE 0,5 x que contenía bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), la electroforesis se efectuó en la cámara de electroforesis a un voltaje constante de 150 V durante 30 min con una fuente (Pharmacia LKB Multidrive XL, Suecia). La visualización se realizó mediante la exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador (Macrovue 2011, Pharmacia LKB, Suecia). Se utilizó en la electroforesis el marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (New England Biolabs, Reino Unido).

#### **3.5. Purificación de los VTVs y obtención de los ARNdc genómicos**

Se realizó la purificación de los virus a partir de los 40 aislamientos de *T. vaginalis* según la metodología descrita por Khoshnan y Alderete (1993):  $4 \times 10^9$  células de *T. vaginalis* en fase logarítmica del crecimiento “in vitro” se resuspendieron en 30 mL de solución amortiguadora TNM (NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, Tris -HCl 50 mM, pH 7,5). Las células en suspensión se sonicaron y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10000 g durante 30 min. El

lisado se clarificó al menos dos veces a 10000 g por 20 min a 4 °C. Seguidamente, al lisado celular se le añadió 1 mL de sacarosa al 20 % preparada en solución amortiguadora TNM, el extracto crudo de virus se precipitó mediante ultracentrifugación a 100000 g durante 2 h a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 5 mL de solución de TNM, equilibrado a una densidad de 1,35 g/mL con CsCl y se centrifugó a 100000 g por 24 h a 4 °C. Se colectó 1 mL de la fracción del precipitado de cada tubo, se concentró y desalinizó con solución TNM con filtros de Amicon ultra-15 a partir de las instrucciones del fabricante. El ARN se extrajo de 140 µL del material retenido en el filtro Amicon por el método comercial QIAamp® viral RNA mini kit (Qiagen Inc. EUA) a partir de las instrucciones descritas por el fabricante. La contaminación con ARN de simple cadena se eliminó de la solución de ARNdc mediante la precipitación a 10000 g durante 30 min a 4 °C después de su incubación con LiCl 2 M a -20 °C por 30 min. A continuación la solución de ARNdc se incubó con LiCl 4M a -20 °C por 30 min seguido de una precipitación a 10000 g por 30 min a 4 °C, con el objetivo de concentrar el ARNdc. El precipitado obtenido se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril, lo que constituyó la solución de trabajo de ARNdc. La integridad del ARN viral se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (acápite 3.4.2).

### **3.6. Ensayo de sensibilidad del ARN obtenido de los VTVs**

Para confirmar la naturaleza del ARN obtenido se evaluó la sensibilidad del mismo frente a las enzimas ADNasa y ARNasa. El ARN viral (10 µL) se incubó por 30 min con 1U de ADNasa I (Sigma, St Louis, Masachusset, EUA) y con 0,5 µg/mL de ribonucleasa pancreática (Sigma, St Louis, Masachusset, EUA) en solución amortiguadora 2 x SSC (Acetato de sodio 0,3 M; citrato de sodio 0,03 M pH=7,4) y 0,01 x SSC a 37 °C. La integridad del ARN viral se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (acápite 3.4.2).

### **3.7. Tipificación de la especie de VTVs mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-RCP)**

A partir del ARNdc obtenido en el acápite 3.4, se determinó la especie de VTVs presente en los aislamientos de *T. vaginalis*. Para ello se utilizó la técnica de RT-RCP mediante el método comercial Qiagen one-step RT-RCP (Qiagen, Hilden, Alemania) con cebadores especie-específicos designados por Goodman *et al.* (2011a) (Tabla 2).

**Tabla 2. Cebadores especie-específicos utilizados en la RT-RCP para la tipificación de los VTVs.**

Especie de VTVs	Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	Posición de los nucleótidos <sup>a</sup>	Talla del producto de la RCP
VTV1	VTV1F2875	ATTAGCGGTGTTTGTGATGCA	2875-2895	569pb
	VTV1R3443	CTATCTTGCCATCCTGACTC	3443-3424	
VTV2	VTV2F2461	GCTTGAGCACTGCTCGCG	2461-2478	625pb
	VTV2	TCTCTTTTGGCATCGCTT	3085-3068	
VTV3	VTV3F61	AAATTAATCAACACCCTCC	61-79	437pb
	VTV3R482	CAGATCACTTTGTGTGTC	500-482	
VTV4	VTV4F1338	ATGCCAGTTGCTTTCCG	1338-1354	514pb
	VTV4R1834	TTCCCAATAGTTATCAG	1851-1834	

a- Posición relativa a la hibridación de los cebadores con relación al alineamiento entre las secuencias nucleotídicas de los VTVs informados en el banco de Genes.

La mezcla de reacción (25 µL) contenía: solución amortiguadora de RT-RCP coloreado 1 x con 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solución amortiguadora Q 1 x, 400 µM de cada dNTPs, 1µL de mezcla de las enzimas Ominiscript, transcriptasa reversa Sensiscripts y HotStar Taq ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania), 0,6 µM de cada cebador (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB, Cuba) y 5 µL del ARN extraído de los VTVs. Se incluyó un control negativo con todos los componentes de la RCP excepto el ARN, además de un control negativo del proceso de extracción de ARN. Los parámetros en el termociclador fueron: transcripción reversa a 50 °C por 30 min y activación de la HotStar Taq ADN polimerasa a 95 °C por 15 min; seguido de 40 ciclos correspondientes con 94 °C 30 seg – 50 °C 30 seg – 72 °C 1 min; y una extensión final a 72 °C por 10 min (Goodman *et al.*, 2011a).

El producto amplificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en solución amortiguadora TBE 0,5 x que contenía bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizó en un sistema compacto de imágenes de geles U:Genius (Syngene, Reino Unido). La presencia de la banda específica (Tabla 2) se tomó como la confirmación de la especie de VTVs en los

aislamientos de *T. vaginalis*. Se utilizó en la electroforesis el marcador de peso molecular Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder (MBI, Fermentas, Alemania).

### **3.8. Secuenciación y análisis filogenético de los VTVs**

#### **3.8.1. Secuenciación nucleotídica y análisis del genoma viral de los VTVs**

Se secuenció el genoma viral completo de al menos un representante de cada una de las especies de VTVs detectadas en los aislamientos. Para analizar la organización genómica de los VTVs, se amplificaron fragmentos de ADNc a partir del ARNdc, y estos fragmentos se clonaron y secuenciaron.

El ADNc se sintetizó a partir del ARNdc obtenido en el acápite 3.5 donde se empleó el método comercial Access RT-RCP System (Promega, Madison, WI, EUA), con cebadores al azar, OPA 1 al 5 (Operon Technologie, California, EUA) (Anexo 3) según las instrucciones del fabricante. El extremo 5' del genoma viral se amplificó al utilizar el sistema 5'-RACE (Amplificación Rápida de los Extremos de ADNc), a partir de las instrucciones propuestas por el fabricante (GibcoBRL, Invitrogen, EUA). Los fragmentos de la RCP se purificaron mediante el método comercial QIAquick Gele Extraction Kit (Qiagen Inc, Hilden, Alemania), a partir de las bandas obtenidas del gel de agarosa mediante un corte con bisturí estéril. El ADN extraído se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega Madison, EUA) y transformó en células competentes de *Escherichia coli* JM109 con el método comercial Qiagen PCR Cloning Plus, según las indicaciones de los fabricantes (Qiagen Inc., Hilden, Alemania). Las posibles colonias recombinantes seleccionadas se cultivaron toda la noche en medio LB (medio de Luria Bertani, sólido (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, 15 g de bacto agar, y agua destilada hasta 1000 mL) suplementado con 100 µg/mL de ampicillin a 37 °C con agitación. El ADN plasmídico se purificó a través el método comercial QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen, Inc., Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se determinó la presencia de ADN plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (acápites 3.4.2).

Para obtener las secuencias de los clones de ADNc se utilizó el método comercial ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing kit con los cebadores universales T7 y SP6 (PerkinElmer, Foster City, CA, EUA) y el secuenciador automático ABI 3730 (PerkinElmer, EUA). Se obtuvo la secuencia consenso de cada ADNc al emplear el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) con ajuste manual.

El alineamiento de los productos de ADNc obtenidos por las diferentes estrategias de amplificación mediante el programa MEGA 5.05 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis Versión 5.05, Tamura *et al.*, 2011, [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) permitió obtener la secuencia consenso del genoma viral de cada uno de los VTVs analizados.

Las proteínas "putativas" obtenidas a partir del genoma viral, correspondientes a las dos proteínas que codifican los VTVs (CP y RdRp), se predeterminaron al utilizar el programa ORF finder tool ([bioinformatic.cecal.ula.ve/sms2/orf\\_find](http://bioinformatic.cecal.ula.ve/sms2/orf_find)). El peso molecular de las mismas y el punto isoeléctrico (pI) se determinaron con el programa ExPASy ([ca.expasy.org/tools/pi\\_tool](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool)).

La similitud de los genomas virales obtenidos con otros genomas informados en el Banco de Genes (en inglés, GenBank) se determinó mediante el programa *Blast* (Basic Local Alignment Search Tool, siglas en inglés; Altschuld *et al.*, 1997).

### **3.8.2. Análisis filogenético de los VTVs obtenidos de los aislamientos cubanos de *T. vaginalis***

Las secuencias aminoacídicas obtenidas de cada uno de los VTVs secuenciados correspondientes a las proteínas CP y RdRp, se alinearon mediante el programa MEGA 5.05 con las secuencias de otros VTVs y otros miembros de la familia *Totiviridae*, previamente publicados en el Banco de genes y cuyos códigos de acceso se muestran en el Anexo 4.

Este mismo programa se utilizó para construir los árboles filogenéticos mediante los métodos basados en distancia y caracteres. Las distancia de las secuencias aminoacídicas predeterminadas se determinaron al emplear el modelo de p-distance, y los árboles se

construyeron mediante los métodos de Unión al Vecino (NJ, siglas en inglés Neighbor-Joining) (Saitou y Nei, 1987), Evolución mínima (Rzhetsky y Nei, 1992), Máxima Parsimonia (Eck y Dayhoff, 1966; Fitch, 1971) y Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) (Felsenstein, 1981). El soporte de los grupos monofiléticos se determinó por el método de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 2000 réplicas. De manera adicional se detectaron los grupos de secuencias mediante el análisis de las redes filogenéticas inferidas de la distancia ML por el método de Red Unión al Vecino (Neighbor-Net, en inglés), mediante el programa SplitsTree4 (Versión 4.10, 2008) (Huson, 1998; Huson y Bryant, 2006).

### **3.9. Análisis del polimorfismo genético de los aislamientos de *T. vaginalis* y su asociación con la presencia de VTVs**

#### **3.9.1. Detección de aislamientos infectados con especies de la clase *Mollicutes***

Se detectó la presencia de especies de la clase *Mollicutes*, en específico *M. hominis* en los aislamientos de *T. vaginalis* mediante la RCP. La presencia de *M. hominis* u otros miembros de esta clase en los aislamientos del parásito afecta los resultados del polimorfismo genético obtenido por la técnica de RAPD y las posteriores asociaciones que se realizaron en este estudio.

Como controles positivos se utilizaron cepas de referencia de la clase *Mollicutes*: *Mycoplasma genitalium* aislamiento R32G, *M. hominis* ATCC 23114, *Ureaplasma urealyticum* ATCC 27618, *Ureaplasma parvum* ATCC 2815, todos depositados en la colección del Departamento de Bacteriología del IPK.

Todos los aislamientos se evaluaron por el método de la RCP específico para la clase *Mollicutes* (Fernández-Molina *et al.*, 2003). En este estudio se utilizaron los cebadores MollF y MollR específicos para una región común complementaria al ARN ribosomal 16S (Tabla 3). La mezcla de reacción (50 µL) contenía: solución amortiguadora coloreado de la RCP 1 x (CoralLoad PCR buffer, en inglés) con 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solución amortiguadora Q 1 x, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1,25 U de HotStar Taq Plus ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania), 0,5 µM de cada cebador (Tabla 3) (CIGB, Cuba) y 5

μL de ADN genómico (De cepas de referencia o de aislamientos de *T. vaginalis*). Se incluyó un control negativo con todos los componentes de la RCP excepto el ADN, y dos controles positivos que contenían 10 ng de ADN de *M. hominis* ATCC 23114 y *U. urealyticum* ATCC 27618, respectivamente. Los parámetros en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95 °C 5 min; seguido de 39 ciclos correspondientes con desnaturalización 94 °C 1 min – hibridación 55 °C 1 min – extensión 72 °C 2 min; y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los amplicones resultantes se analizaron mediante gel de agarosa a 2 % en solución amortiguadora TBE 0,5x que contenía bromuro de etidio (0,5 μg/mL) y visualizado mediante el sistema compacto de imágenes U:Genius (Syngene, Reino Unido). Se utilizó en la electroforesis el marcador de peso molecular Molecular Gene<sup>TM</sup> Ruler 100bp DNA ladder (MBI, Fermentas, Alemania).

La RCP múltiple, descrita por Rodríguez *et al.* (2007) se utilizó para identificar las principales especies dentro de la clase *Mollicutes*: *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum*, que están relacionadas con algunas patologías del tracto urogenital (Rodríguez *et al.*, 2007). La RCP múltiple se diseñó para la identificación simultánea de genes específicos para *M. genitalium* (proteína de adhesión MgPa, 78pb), *M. hominis* (16S rARN, 280pb), *U. parvum* (región específica entre 16S y 23S rARN, 812pb) y *U. urealyticum* (ureasa, 418pb). Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 3. La mezcla de reacción (50 μL) contiene: solución amortiguadora coloreado de RCP 1x que contiene 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solución amortiguadora Q 1 x, 200 μM de cada dNTPs, 1,25 U de HotStar Taq Plus ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania), 0,25 μM de cada cebador (CIGB, Cuba), y 5 μL de ADN genómico (De cepas de referencia o de aislamientos de *T. vaginalis*). Se incluyó un control negativo con todos los componentes de la RCP excepto el ADN, y cuatro controles positivos que contenían 10 ng de ADN de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*, respectivamente. Los parámetros en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; seguido de 35 ciclos correspondientes con desnaturalización 94 °C 30 seg – hibridación 55 °C 30 seg – extensión 72 °C 1 min; y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los amplicones resultantes se analizaron mediante un gel de agarosa al 2 % en solución amortiguadora TBE 0,5x que contenía bromuro de etidio (0.5 μg/mL) y visualizado a través del sistema compacto de imágenes U:Genius (Syngene, Reino Unido). Se utilizó en la

electroforesis el marcador de peso molecular Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder (MBI, Fermentas, Alemania).

**Tabla 3. Cebadores utilizados en las RCP para la detección de la clase *Mollicutes* y la RCP múltiple para la detección de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*.**

Clase o Especie	Código del cebador	Secuencia (5'-3')	Talla del producto de la RCP
<i>Mollicutes</i>	Moll F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA	1500 pb
	Moll R	GGTAGGGATACCTTGTTACGACT	
<i>M. genitalium</i>	MgPaF	GAGAAATACCTTGATGGTCAGCAA	78 pb
	MgPaR	GTAAATATCATATAAAGCTCTACCGTTGTTATC	
<i>U. urealyticum</i>	UUS2	CAGGATCATCAAATCAATTCAC	418 pb
	UUA2	CAT AAT GTT CCC CTT CGT CTA	
<i>U. parvum</i>	UPS	CTA CAT TAA ATG TCG GCC CGA ATG G	812 pb
	UPSA	TAG AAT CCG ACC ATA TGA ATT TTT A	
<i>M. hominis</i>	MH1	TGA AAG GCG CTG TAA GGC GC	280 pb
	MH2	GTC TGC AAT CAT TTC CTA TTG CAA A	

### 3.9.2. Técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Se emplearon un total de 30 cebadores, 10 de los cuales se diseñaron en nuestro laboratorio (Tv-1 al Tv-10), para ello se tuvo en cuenta el diseño al azar con un contenido de G+C entre 60 y 70 % y con los extremos no complementarios (Steffen *et al.*, 1999) y 20 provenían de la serie OPA (OPA-1 al 20) (Operon Technologie inc, California, EUA) (Anexo 3).

En la reacción de amplificación del ADN se tuvieron en cuenta las cantidades de los componentes de la mezcla de reacción normalizada con anterioridad (Fraga *et al.*, 2002). Así la amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía 2,5 µL de solución amortiguadora de amplificación 10 x (Boehringer Mannheim, Alemania), 200 µM de cada dNTPs (Boehringer Mannheim, Alemania), 25 pmol de cada cebador, 2 U de Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim, Alemania) y 10 ng de ADN genómico de los aislamientos de *T. vaginalis*. Se incluyó un control negativo en cada ensayo que contenía agua destilada en lugar de ADN molde.

Posteriormente, se procedió a realizar la reacción de amplificación del ADN en un termociclador (Perkin Elmer, EUA), a partir del protocolo descrito por Vanáčová *et al.* (1997), con el siguiente perfil de amplificación: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de: desnaturalización a 94 °C 1 min, hibridación a 35 °C 1 min y extensión 72 °C 2 min, con una extensión final, después del último ciclo, a 72 °C por 15 min. Para la detección del producto, se analizaron 20 µL de cada mezcla resultante mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %, preparado en solución amortiguadora TBE 0,5x que contenía bromuro de etidio 0,5 µg/mL. Se utilizó en la electroforesis los marcador de peso molecular 1 kb (Promega, EUA) y Molecular Gene<sup>TM</sup> Ruler 100bp DNA ladder (MBI, Fermentas, Alemania). La presencia o ausencia de las bandas se determinó visualmente con luz ultravioleta al utilizar un transiluminador.

### **3.9.3. Análisis del polimorfismo genético de los aislamientos**

A partir de que en los marcadores RAPD el fenotipo dominante de un locus se considera como la presencia de una banda, y el fenotipo recesivo es la ausencia de esa banda, los individuos se compararon fenotípicamente en cada locus. El análisis se realizó mediante la clasificación de las bandas como presentes (1) o ausentes (0) para cada aislamiento, a partir de lo cual se construyó una matriz binaria. El inverso del coeficiente de similitud de Jaccard (Sj, modificado por Sneath, 1957) se calculó de la manera siguiente:  $S_j = 1 - a / (a + b + c)$  donde *a* representa el número de bandas compartidas entre los dos aislamientos, *b* representa el número de bandas presentes en el aislamiento 1 y ausentes en el 2, *c* representa el número de bandas ausentes en el aislamiento 1 y presentes en la 2, como resultado se obtuvo una matriz de distancia a partir de la cual, mediante la estrategia de agrupaciones (UPGMA), se construyeron los dendogramas, con el empleo de un paquete de programa FreeTree, versión 0.9.1.59 (Pavlicek *et al.*, 1999) basados en los resultados obtenidos con los 30 cebadores. El análisis de bootstrap se realizó con 1000 réplicas.

### **3.9.4. Prueba estadística de concordancia de árboles**

La correspondencia entre la presencia de VTVs con su posición en el árbol obtenido mediante el análisis del RAPD, así como las manifestaciones clínicas en las pacientes con el análisis del polimorfismo genético, se estimó a través de la Prueba de Permutación de Probabilidades de 1

cola (Permutation Tail Probability Test) (Adams y Anthony, 1996). La distancia media entre hermanos OTU (cepas hermanas o ramas hermanas en un árbol) se calculó del árbol genealógico obtenido por los datos del RAPD mediante el método del NJ. Después, 100,000 árboles se generaron por permutación al azar de las ramas apicales. Para cada árbol permutado, se calculó la distancia media entre hermanos (OTU) y esta distancia se comparó con la distancia media del árbol genealógico inferido. Si la distancia media del árbol genealógico inferido cayó 5 % de las distancias menores de los árboles permutados, se consideró que existió correspondencia entre la propiedad biológica analizada con la posición del aislamiento en el árbol filogenético estadísticamente significativa. La prueba se realizó con el programa Trept (Flegr y Zabož, 1998). Para determinar la concordancia con la infección con VTVs se tuvo en cuenta la presencia como 1 y la ausencia 0. En el caso de la concordancia con la clasificación de los aislamientos a partir de las manifestaciones clínicas en las pacientes, se le asignó 1 a los aislamientos de pacientes sintomáticos y 0 a los provenientes de pacientes asintomáticos.

### **3.10. Caracterización genética de marcadores de RAPD asociados a la virulencia**

#### **3.10.1. Clonaje y secuenciación de los fragmentos de RAPD**

Los fragmentos de RAPD-RCP seleccionados como marcadores genéticos de RAPD asociados a la virulencia, se cortaron del gel de agarosa con un bisturí estéril, después de extraídos se purificaron al utilizar el método comercial QIAquick Gel Extraction Kit mediante las instrucciones de los fabricantes (Qiagene, Hilde, Alemania).

Los fragmentos de la RCP se usaron como molde para la re-amplificación con los cebadores específicos con vistas a confirmar el fragmento correcto. El producto de la RCP purificado se clonó directamente en el vector pGEM-T Easy (Promega Madison, EUA) a partir de las instrucciones descritas por el fabricante. Los recombinantes de ADN se usaron para transformar las células competentes de *E. coli* JM109. Los recombinantes se identificaron como colonias blancas en placas LB con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido) e IPTG (siglas en inglés de isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido). Las colonias recombinantes transformadas producto del tamizaje por RCP se tomaron y se adicionaron en 20  $\mu$ L de agua

estéril calentándose a 100 °C por 5 min. Se utilizó 1,2 µL de esta solución en la reacción de amplificación con el cebador que le dio origen. El ADN de los plásmidos se aisló de los recombinantes mediante el método comercial de QIAprep Spin Plasmid Kit (Qiagen, Hilde, Alemania) según el protocolo estándar que proporciona el fabricante. Una alícuota del plásmido de ADN purificado (5 µL) se analizó nuevamente por la RCP mientras que otra alícuota se digirió con las enzimas de restricción *SalI* y *NcoI* (Fermentas, St Leon Rot, Alemania). El plásmido recombinante se secuenció al emplear el método comercial ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing kit (PerkinElmer, Foster City, CA, EUA) con el juego de cebadores T7 y SP6 mediante el secuenciador automático ABI 3730 (Perkin Elmer). Se obtuvo la secuencia consenso de cada producto de RAPD, a partir del alineamiento de las secuencias de ambas cadenas, mediante el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) con ajuste manual.

### **3.10.2. Análisis de las secuencias**

A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas se determinaron los ORF que predicen las secuencias aminoacídicas deducidas, mediante el programa ORF finder tool (bioinformatic.cecal.ula/sms2/orf\_find). Las secuencias nucleotídicas y las secuencias aminoacídicas deducidas de cada uno de los marcadores genéticos de RAPD se compararon con la secuencias nucleotídicas y aminoacídicas disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, siglas en inglés National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos) mediante los programas Blastn y Blastp, respectivamente, (Basic Local Alignment Search Tool; Altschuld *et al.*, 1997) disponibles en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> del NCBI. Las secuencias alineadas tanto para las secuencias nucleotídicas como aminoacídicas, se consideraron con importancia biológica cuando presentaban un valor E (E-value) por debajo de  $10^{-5}$  para secuencias nucleotídicas y por debajo de  $10^{-2}$  para las secuencias aminoacídicas (Hsiang y Baillie, 2005).

### **3.11. Relación entre la presencia de VTVs y su especie con el nivel de adhesión de los aislamientos de *T. vaginalis* a las células HeLa**

Los niveles de adhesión a las células HeLa se midieron en los aislamientos de *T. vaginalis* positivos o no a VTVs, según la especie de VTVs y según la clasificación de los aislamientos

en función de las manifestaciones clínicas de las pacientes. Los valores de adhesión a células HeLa de los aislamientos fueron obtenidos en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Rojas *et al.*, 2004b). Estos datos se almacenaron para ser procesados en el paquete de programas GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Cal. EUA).

Después de realizados los ensayos de normalidad descritos por Shapiro-Wilk, y D'Agostino y Pearson, se compararon las medianas de los niveles de adhesión del grupo de parásitos infectados con virus, con los niveles de adhesión de los parásitos no infectados con virus. Se compararon además los niveles de adhesión de los aislamientos infectados con VTV-1 con los aislamientos infectados con VTV-2. De igual forma, finalmente se compararon la mediana de adhesión de los aislamientos en función de la clasificación clínica de los aislamientos (leve, moderado, severo). En todos los casos se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de *P* fue menor que 0,05.

### **3.12. Relación entre la presencia de VTVs y las manifestaciones clínicas de las pacientes**

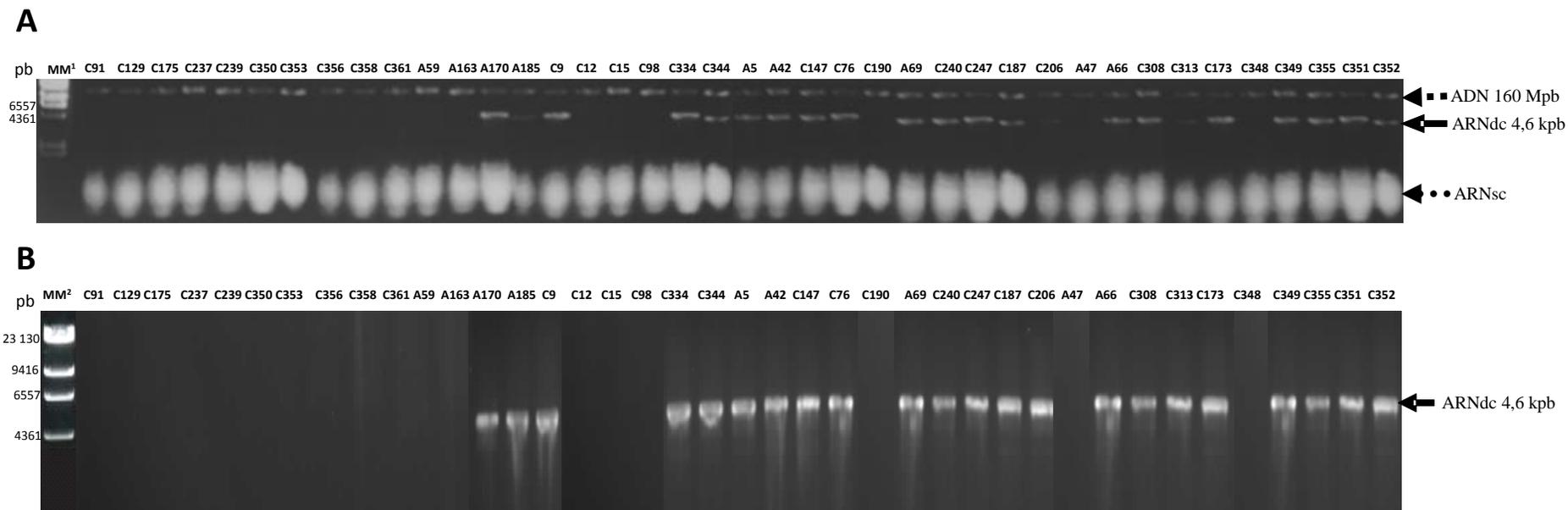
Los datos clínicos de las pacientes y la presencia o ausencia de VTVs en los respectivos aislamientos, se recogieron y almacenaron para ser procesados en el paquete de programas EPIINFO, versión 6,04 (Dean *et al.*, 2004). Los análisis estadísticos se realizaron mediante pruebas de proporciones para comparar los porcentajes. La prueba exacta de Fisher se usó para comparar los porcentajes cuando el número de casos analizados fue escaso. Se crearon tablas de contingencia con el fin de realizar el análisis de regresión logística entre los aislamientos de pacientes sintomáticas y las pacientes asintomáticas en general, así como para cada uno de los síntomas, y se tomó como referencia el grupo de individuos asintomáticos en general y para cada síntoma. Se empleó también el cálculo de la oportunidad relativa (Martín-Moreno y Banegas, 1997) o razón de los productos cruzados (OR). En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de *P* fue menor que 0,05.

# ***RESULTADOS***

## **IV. RESULTADOS**

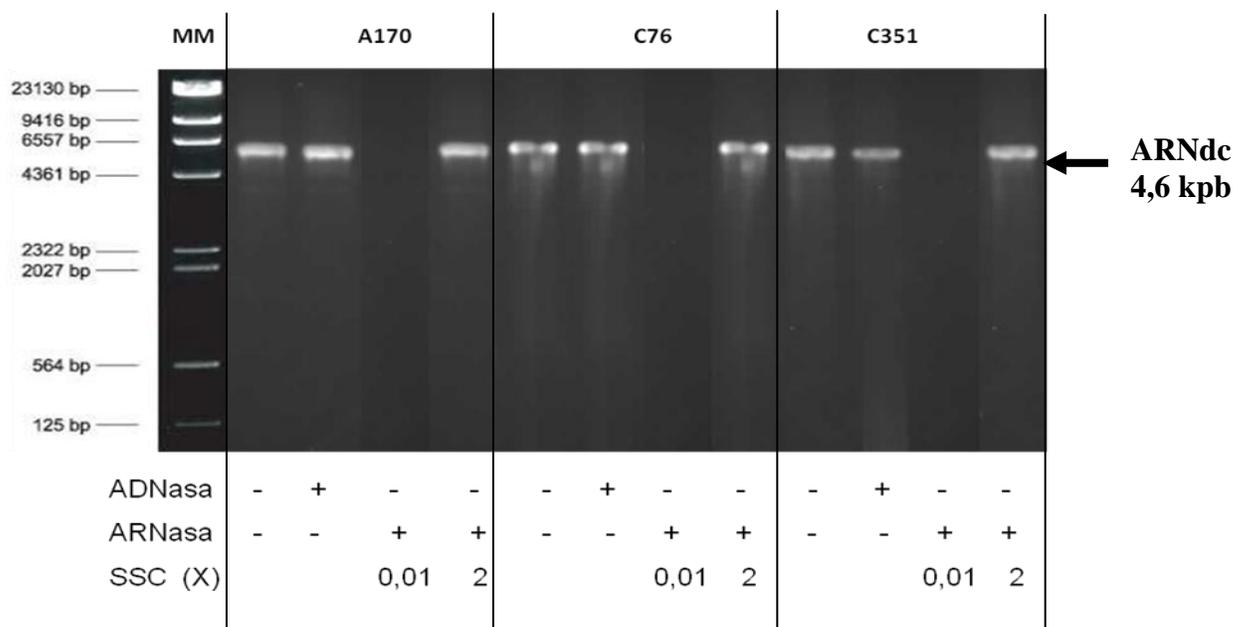
### **4.1. Presencia y tipificación de los VTVs en aislamientos cubanos de *T. vaginalis***

La electroforesis en gel de agarosa mostró la presencia de ARNdc obtenido de la extracción total de ácidos nucleicos (Figura 4A) y la purificación de los virus presentes en los 40 aislamientos analizados, permitió detectar un fragmento de aproximadamente 4,6 kpb correspondiente al ARNdc genómico de los VTVs en 22 de ellos (Figura 4B). El porcentaje de aislamientos infectados con VTVs en nuestro estudio resultó ser de 55 %.



**Figura 4. A:** Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de los ácidos nucleicos procedentes de 40 aislamientos frescos de *T. vaginalis*. **B:** Electroforesis en gel de agarosa (1 %) del ARNdc viral obtenido de los virus purificados a partir de los 40 aislamientos de *T. vaginalis*. Carril MM<sup>1</sup>: Marcador de peso molecular 1 kb (Promega, EUA). MM<sup>2</sup>: Marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (New England Biolabs, Reino Unido). En cada carril se representa el aislamiento utilizado. La flecha continua indica la posición del ARNdc, la discontinua con círculos el ARN y la discontinua con cuadrados el ADN genómico.

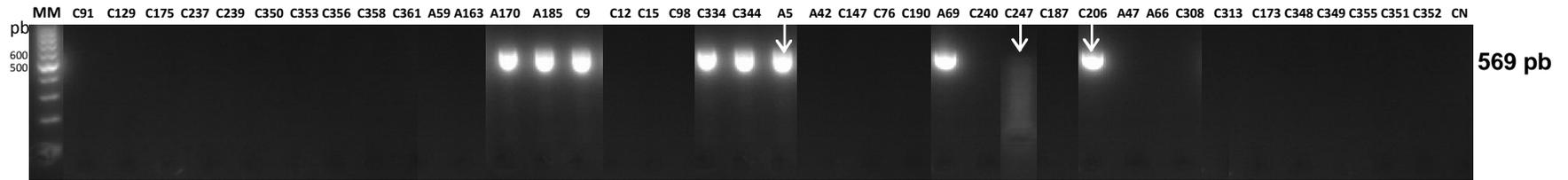
La estabilidad del genoma de los virus frente a la digestión con ADNasa I confirmó que la naturaleza de los mismos es ARN. La estabilidad a la presencia de ribonucleasa en solución amortiguadora con alta fuerza iónica (2 x SSC) y la susceptibilidad a solución amortiguadora con baja fuerza iónica (0,01 x SSC) permitieron verificar que la naturaleza del ARN viral es de doble cadena. La Figura 5, muestra el comportamiento frente a las digestiones con ADNasa I y ARNasa de 3 de los fragmentos genómicos virales purificados.



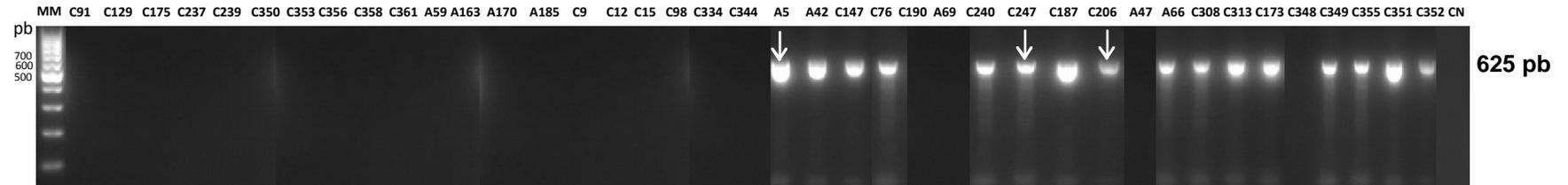
**Figura 5. Sensibilidad del ARN obtenido en 3 de los aislamientos de VTVs seleccionados al azar frente a las enzimas ADNasa I y ARNasa. MM: Marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (New England Biolabs, Reino Unido). En cada carril se representa el aislamiento de *T. vaginalis* de donde procedían los ARN. En la parte inferior del gel se señala la digestión con ADNasa o ARNasa en presencia de solución amortiguadora con alta fuerza iónica (2 x SSC) y a solución amortiguadora con baja fuerza iónica (0,01 x SSC). + si se digirió y – si no se digirió.**

En la Figura 6, se muestran los resultados de la tipificación de cada uno de los aislamientos del parásito. Se detectaron 22 aislamientos positivos a VTVs todos infectados con la especie de VTV 1 y/o 2, seis infectados solamente con la especie VTV-1 (27,3 %), 13 infectados con la especie de VTV-2 (59,1 %) y en tres aislamientos se evidenció la presencia de doble infección de VTV -1 y -2 (13,6 %).

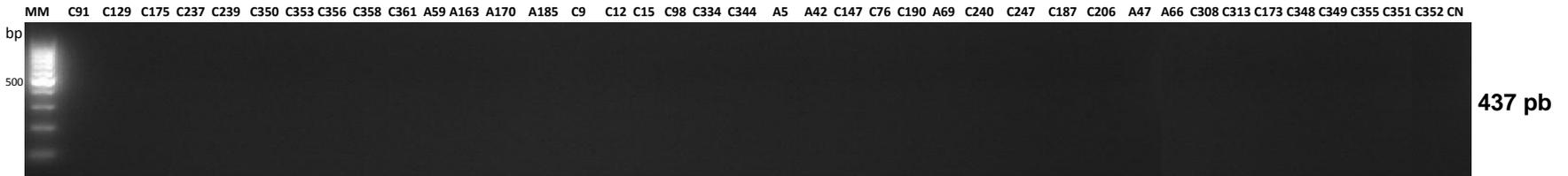
**VTV-1**



**VTV-2**



**VTV-3**



**VTV-4**

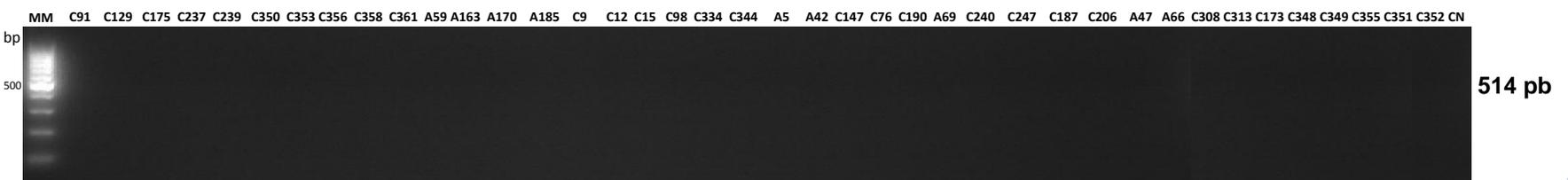


Figura 6. Amplificación mediante la RT-RCP de fragmentos especie específicos para la tipificación de los VTVs. La electroforesis en gel de agarosa al 2 % muestra la amplificación con cebadores específicos para cada especie VTV-1, VTV-2, VTV-3 y VTV-4. MM: Marcador de Peso Molecular Gene<sup>TM</sup> Ruler 100bp DNA ladder (MBI, Fermentas, Alemania). CN: Control negativo RT-RCP. En cada carril se representa el aislamiento de *T. vaginalis*. La flecha indica los aislamientos con co-infección de VTVs.

#### **4.2. Caracterización y análisis de la secuencia genómica de tres aislamientos de VTVs**

Tres VTVs, correspondientes a los aislamientos C344, C76 y C351 se seleccionaron para realizar la secuenciación completa del genoma viral. Estos representan las dos especies de VTVs encontradas en los aislamientos estudiados y corresponden a cada uno de los tres grupos en los que se clasificaron los aislamientos sintomáticos, a partir de las manifestaciones clínicas de las pacientes. Así se seleccionó C344, un aislamiento clasificado como leve y que solo mostró la presencia de la especie de VTV-1; el aislamiento C76, clasificado como moderado, que mostró la presencia de la especie de VTV-2 y el aislamiento C351, clasificado como severo, que mostró igualmente la presencia de la especie VTV-2 (Figura 6, Anexo 2).

Se determinó el genoma completo de los VTV-C344, VTV-C76 y VTV-C351 cuya talla fue de 4,657, 4,689 y 4,686 nucleótidos, respectivamente. Estas secuencias se publicaron en el Banco de Genes bajo los siguientes números de acceso: JF436869, JF436870 y JF436871.

El porcentaje de identidad de ARNdc genómico del VTVs purificado a partir del aislamiento C344 fue de 82,9 %, al compararse con el genoma de los aislamientos correspondientes a la especie VTV-1 (VTV1-1, VTV1-T5, VTV1-IH2, VTV1-Changhun, VTV1-UH9, VTV1-UR1, VTV1-OC3, VTV1-OC4 y VTV1-OC5). Además se observó una región conservada en el extremo 3'-terminal (secuencia de 9-nts–UAUACCUUC- de la cadena positiva) que se informó previamente para esta especie de virus. Igualmente, se presentó en el extremo 5'-terminal de la cadena positiva una región conservada de 7-nts (5'- CAACAUU-3'), presente en todos los aislamientos VTV-1 que se encuentran en el Banco de Genes.

El ARNdc genómico de VTVs purificados a partir de los aislamientos C76 y C351 mostró una identidad de secuencia de 84,7 y 84,1 % respectivamente, con el genoma de la especie VTV-2 (VTV2-1, VTV2-UR1, VTV2-OC3 y VTV2-OC5) (Tabla 4). Además, se identificaron las regiones conservadas, previamente informadas para VTV-2 en el extremo 5'-terminal (5-nts – GCUUU-) y 3'-terminal (3-nt –GUC-) de la cadena positiva.

**Tabla 4. Identidad de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de CP y RdRp de los VTVs publicados en el Banco de Genes y las nuevas secuencias obtenidas en este trabajo.**

	Secuencia nucleotídica				Secuencia aminoacídica							
	Identidad (%)				CP				RdRp			
					Identidad (%)				Identidad (%)			
	VTV1 <sup>a</sup>	VTV2 <sup>b</sup>	VTV3 <sup>c</sup>	VTV4 <sup>d</sup>	VTV1 <sup>e</sup>	VTV2 <sup>f</sup>	VTV3 <sup>g</sup>	VTV4 <sup>h</sup>	VTV1 <sup>i</sup>	VTV2 <sup>j</sup>	VTV3 <sup>k</sup>	VTV4 <sup>l</sup>
<b>VTV-C344</b>	<b>82,9</b>	41,5	40,7	39,9	<b>85,6</b>	19,5	15,7	19,4	<b>85,5</b>	30,1	29,1	31,4
<b>VTV-C76</b>	39,9	<b>84,7</b>	47,7	46,4	18,0	<b>84,4</b>	30,8	28,8	28,0	<b>84,3</b>	43,1	43,1
<b>VTV-C351</b>	39,6	<b>84,1</b>	46,8	45,6	18,9	<b>83,7</b>	30,6	28,5	27,2	<b>81,4</b>	41,7	41,2

En negritas los mayores valores de identidad.

<sup>a</sup> Valor medio de la identidad con VTV1-1(U08999), VTV1-T5(U57898), VTV1-IH2(DQ270032), VTV1-Changhun(DQ528812), VTV1-UR1 (HQ607513), VTV1-UH9 (HQ607516), VTV1-OC3 (HQ607517), VTV1-OC4 (HQ607521) y VTV1-OC5 (HQ607523).

<sup>b</sup> Valor medio de la identidad con VTV2-1(AF127178), VTV2-UR1 (HQ607514), VTV2-OC3 (HQ607518) y VTV2-OC5 (HQ607524).

<sup>c</sup> Valor medio de la identidad con VTV3-1(AF325840), VTV3-UR1 (HQ607515), VTV3-OC3 (HQ607519) y VTV3-OC5 (HQ607525).

<sup>d</sup> Valor medio de la identidad con VTV4-1 (HQ607522), VTV4-OC3 (HQ607520) y VTV4-OC5 (HQ607526).

<sup>e</sup> Valor medio de la identidad con VTV1-1(NP\_620729), VTV1-T5(ACC55468), VTV1-IH2(ABC86750) y VTV1-Changhun (ABF577112), VTV1-UR1 (AED99811), VTV1-UH9 (AED99813), VTV1-OC3 (AED99815), VTV1-OC4 (AED99817) y VTV1-OC5 (AED99819).

<sup>f</sup> Valor medio de la identidad con VTV2-1(NP\_624322), VTV2-UR1 (AED99805), VTV2-OC3 (AED99807) y VTV2-OC5 (AED99809).

<sup>g</sup> Valor medio de la identidad con VTV3-1(NP\_659389), VTV3-UR1 (AED99799), VTV3-OC3 (AED99801) y VTV3-OC5 (AED99803).

<sup>h</sup> Valor medio de la identidad con VTV4-1 (AED99795), VTV4-OC3 (AED99793) y VTV4-OC5 (AED99797).

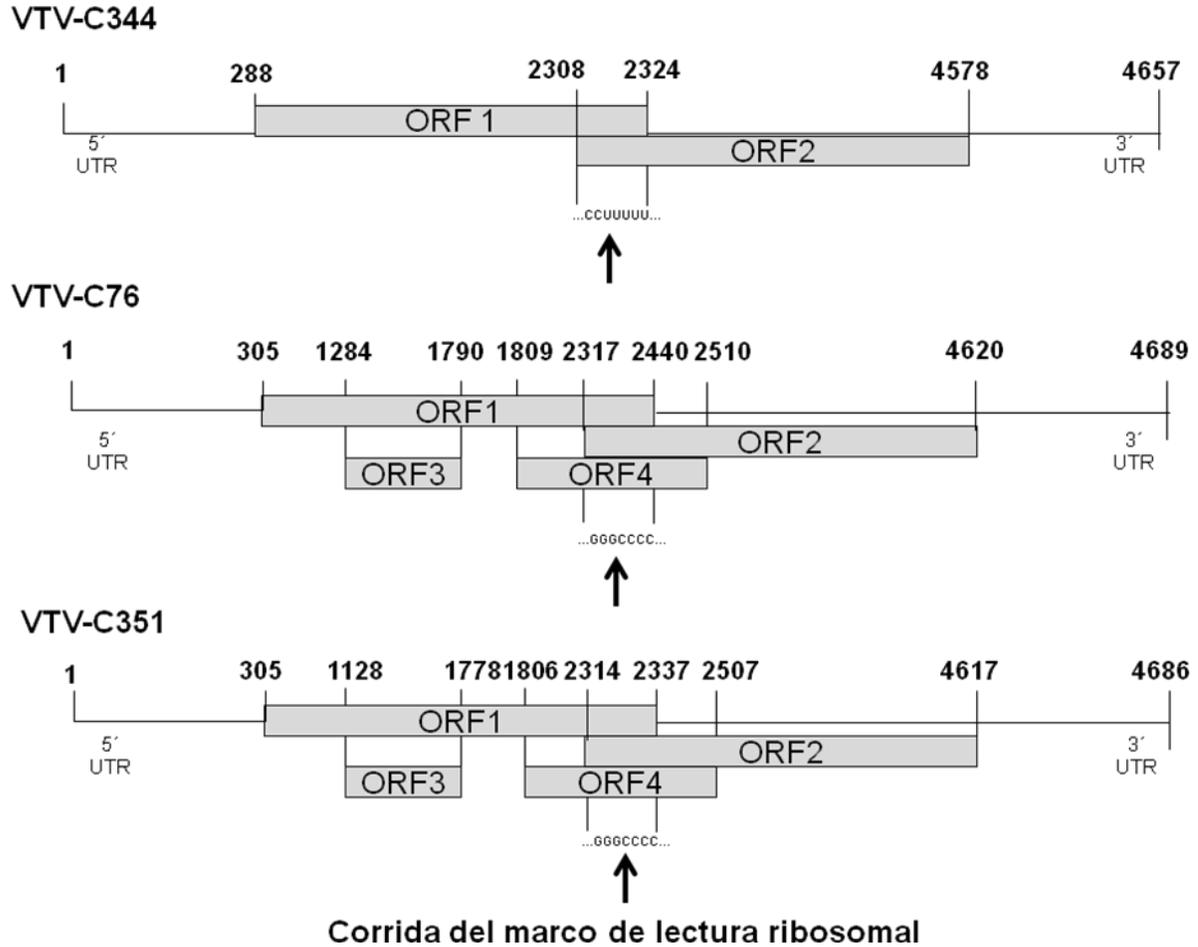
<sup>i</sup> Valor medio de la identidad con VTV1-1(AAA62868), VTV1-T5(AAC55469), VTV1-IH2(ABC86751) y VTV1-Changhun(ABF57713), VTV1-UR1 (AED99812), VTV1-UH9 (AED99814), VTV1-OC3 (AED99816), VTV1-OC4 (AED99818) y VTV1-OC5 (AED99820).

<sup>j</sup> Valor medio de la identidad con VTV2-1(NP\_624323), VTV2-UR1 (AED99806), VTV2-OC3 (AED99808) y VTV2-OC5 (AED99810).

<sup>k</sup> Valor medio de la identidad con VTV3-1(NP\_659390), VTV3-UR1 (AED99800), VTV3-OC3 (AED99802) y VTV3-OC5 (AED99804).

<sup>l</sup> Valor medio de la identidad con VTV4-1 (AED99796), VTV4-OC3 (AED99794) y VTV4-OC5 (AED99798).

La secuencias de proteínas deducidas de la cadena positiva del ARN del genoma del VTV-C344 predice un solapamiento de dos ORFs (ORF1 y 2), acoplados con un evento de corrida del marco de lectura ribosomal en la cadena viral positiva (Figura 7).



**Figura 7. Diagrama de codificación de los genomas virales de VTV-C344, C76 y C351. Marco abierto de lectura (ORF) 1 (Proteína de la cápside, CP) y 2 (ARN polimerasa ARN dependiente, RdRp). En cada virus la RdRp se expresa como una fusión CP/RdRp seguido de la corrida del marco de lectura ribosomal que se indica. Las regiones no codificantes 5' y 3' (UTR siglas en inglés untranslated region) se indican en la figura.**

El ORF1, en el marco de lectura 1, de VTV-C344 contiene 678 residuos de aminoácidos, comienza con metionina en el primer codón, con un valor predictivo de pI de 7,0 y un peso molecular estimado de 75 kDa. La secuencia de proteínas comparte una similitud por encima de 85,6 % con la CP de los aislamientos de la especie de VTV-1 (Tabla 4). Las tres regiones polipeptídicas conservadas en todas las secuencias CP de los VTVs (Bessarab *et al.*, 2011), se encontraron presentes en la proteína deducida (Anexo 5). El análisis de la secuencia aminoacídica y la identidad de la proteína indica que el ORF1 codifica la CP viral.

El ORF2, en el marco de lectura 3, el cual se solapa con el ORF1, comienza por valina y termina en un codón 80 nucleótidos antes del extremo 3'-terminal. No obstante, el primer codón de metionina (2,374- 2,376 nt) se localizó en la posición 23 en este ORF (Figura 7). Este ORF codifica 756 residuos aminoacídicos con un valor predictivo de pI de 8,16 y un peso molecular estimado de 85,9 kDa. El ORF2 comparte una identidad por encima del 85,5 % con la proteína RdRp de los aislamientos de la especie VTV-1 (Tabla 4). Las 8 regiones polipeptídicas conservadas cortas que se describen para las secuencias de RdRp en la familia *Totiviridae* (Routhier y Bruenn, 1998; Bessarab *et al.*, 2000), se encuentran presentes en la proteína deducida (Anexo 6). El análisis de la secuencia aminoacídica del ORF2 mostró que se corresponde con una proteína RdRp putativa.

La región conservada de 7 nucleótidos CCTTTTT (2,312-2,318 nt) (splippage heptamer, en inglés), que permite el corrimiento del marco de lectura ribosomal para la traducción de la RdRp se identificó dentro de los 17 nt de solapamiento entre CP-RdRp, (2,308 - 2,324 nt) y esta se corresponde con una región putativa conservada entre todos los genomas procedentes de aislamientos correspondientes a la especie de VTV-1 (Figura 7) (Tai e Ip, 1995; Su y Tai, 1996; Kim *et al.*, 2007; Goodman *et al.*, 2011a,b).

Si se tiene en cuenta el resultado de la identidad de las secuencias, las regiones conservadas en los extremos 5' y 3'-terminal, la caracterización del genoma, la predicción aminoacídica, y la tipificación mediante la RT-RCP (Figura 6) el aislamiento VTV-C344 se puede clasificar como especie tipo VTV-1 y se nombró como VTV1-C344.

La secuencia de proteínas deducidas de la cadena positiva del ARN del genoma del VTV-C76 y VTV-C351 predicen igualmente un solapamiento de dos ORF (ORF1 y 2) acoplado con un evento de corrida del marco de lectura ribosomal en la cadena viral positiva (Figura 7). Los ORF1 del VTV-C76 y VTV-C351 en el marco de lectura 2, codifican 711 y 710 residuos de aminoácidos, comienzan por el codón de metionina, con valores predictivos de pI de 8,54 y 6,62 y pesos moleculares estimados de 79,3 y 79,1 kDa, respectivamente. Las secuencias de proteínas muestran un porcentaje de identidad con la CP de los aislamientos de la especie VTV-2 de 84,4 y 83,7 %, respectivamente (Tabla 4). Los tres polipéptidos cortos conservados entre las CP de los VTVs (Bessarab *et al.*, 2011), están presentes en las secuencias de las proteínas predichas. Además, están presentes otras 3 regiones motivos (motif, en inglés) conservadas dentro de las CPs, que solamente se encuentran en los VTV-2 y -3 (Anexo 5) (Bessarab *et al.*, 2011). La identidad de las proteínas indica que los ORF1 de los dos virus codifican la CP viral.

Los ORF2 de VTV-C76 y VTV-C351 (2,314-4,617 nt) en el marco de lectura 1, comienza con una arginina y termina en un codón de terminación, 70 nt del extremo 3'-terminal, sin embargo, el primer codón de metionina se encuentra localizado en la posición 21 de este ORF (2,377-2,379 nt y 2,374-2,376 nt, para VTV-C76 y VTV-C351, respectivamente) (Figura 7). Estos contienen 767 residuos de aminoácidos con un valor predictivo de pI de 9,38 y 9,13 y un peso molecular estimado de 87,3 y 87,8 kDa, respectivamente. El ORF2 de ambos VTVs muestra una identidad por encima de 81,4 % con la proteína RdRp de los aislamientos correspondientes a la especie VTV-2 (Tabla 4). Las 8 regiones polipeptídicas conservadas encontradas en todas las secuencias de RdRp de la familia *Totiviridae*, se encuentran presentes en las proteínas predichas (Routhier y Bruenn, 1998; Bessarab *et al.*, 2000) (Anexo 6). La secuencia deducida del ORF2 en ambos virus mostró que es una RdRp putativa.

Dentro de los 124 nt de solapamiento entre los genes CP y RdRp (2,317-2,440 nt y 2,314-2,437 nt para VTV-C76 y VTV-C351, respectivamente), se encontró presente una región conservada de 7 nucleótidos (GGGCCCC) informados para los genomas de VTV-2 que permite el corrimiento del marco de lectura ribosomal para la traducción de la RdRp presente

en ambos aislamientos en la posición 2,392-2,398 nt y 2,389-2,395 nt (Figura 7) (Bessarab *et al.*, 2000; Goodman *et al.*, 2011a,b).

Dos ORF extras, descritos previamente en los genomas de los VTV-2, se encontraron presentes en ambos genomas virales. El ORF3 en el marco de lectura 3, comienza con el codón de metionina en los VTV-C76 (1,284-1,790 nt) y VTV-C351 (1,128-1,787 nt). La masa molecular estimada es de 18,6 y 24,5 kDa y un valor predictivo de pI de 9,84 y 10,85, respectivamente. El ORF4 en el marco de lectura 3, localizado corriente abajo (downstream, en inglés) del ORF3, se inicia con el codón de metionina en los VTV-C76 (1,809-2,510 nt) y VTV-C351 (1,806- 2,507 nt), tiene un peso molecular estimado de 25,3 kDa y un valor predictivo de pI de 11,05. Estas proteínas no tienen similitud con proteínas secuenciadas e incluidas en el Banco de Genes.

Si se tiene en cuenta el resultado de la identidad de las secuencias, las regiones conservadas en los extremos 5´ y 3´ terminal, la caracterización del genoma, la predicción aminoacídica, y la tipificación mediante la RT-RCP (Figura 6), los aislamientos VTV-C76 y VTV-C351 se pueden clasificar especie tipo VTV-2 y entonces se nombraron como VTV2-C76 y VTV2-C351.

#### **4.3. Análisis filogenético de los VTVs y la familia *Totiviridae***

Para evaluar las relaciones evolutivas entre los genomas de los VTVs aislados de *T. vaginalis* procedentes de Cuba y los aislamientos de VTVs previamente informados, y de ellos en relación con el resto de los miembros de la familia *Totiviridae*, se analizaron las secuencias de proteínas de los genomas de los VTVs y del resto de los miembros de la familia *Totiviridae* (Anexo 4).

Las relaciones filogenéticas derivadas del análisis de las secuencias completas concatenadas de la CP y RdRp, al utilizar el método de NJ, se muestran en la Figura 8. Cuatro grupos monofiléticos se muestran dentro del árbol obtenido. Uno corresponde a los VTVs, otro agrupa a los *Victorivirus*, *Leishmaniavirus* y *Eimeria brunetti* virus, otro agrupa a los virus del género *Totivirus* y otro corresponde a los *Giardiavirus*. El virus *Eimeria brunetti* ARA 1

(EbV1) se identifica en el árbol filogenético como un taxón independiente entre los aislamientos de *Leishmanivirus* y *Victorivirus*, más estrechamente relacionado con *Victorivirus*.

Los VTVs forman un grupo monofilético separado con un alto valor de bootstrap (100%), distinguible del resto de los virus de la familia. Dos grupos principales se pueden reconocer dentro del grupo *Trichomonasvirus*, un grupo corresponde con los aislamientos reconocidos como especie VTV-1 y otro grupo con los aislamientos correspondientes a las especies VTV-2, 3 y 4. Dentro de este último grupo cada especie de VTVs se agrupa con alto valor de bootstrap (100%).

En la Tabla 5 se muestra la matriz de los valores de distancia p y el porcentaje de similitud entre los cuatro grupos monofiléticos que se observan dentro de los VTVs. Los valores de distancia p mayores que 0,4 y los porcentaje de identidad por debajo del 60 % apoyan el hecho de que cada uno de estos grupos constituye una especie dentro de los VTVs.

**Tabla 5. Matriz de distancia genética y similitud entre las secuencias nucleotídicas de los VTVs correspondiente a los cuatro grupos monofiléticos encontrados dentro de los *Trichomonasvirus*.**

	VTV-1	VTV-2	VTV-3	VTV-4
VTV-1	0,1451 85,5 %	24,3	23,2	26
VTV-2	0,7574	0,1398 86,0 %	38,6	37,6
VTV-3	0,7682	0,6142	0,1084 89,2 %	56,1
VTV-4	0,7400	0,6243	0,4395	0,0811 91,9 %

Distancia genética: valores por debajo de la diagonal

Similitud (%): valores por encima de la diagonal

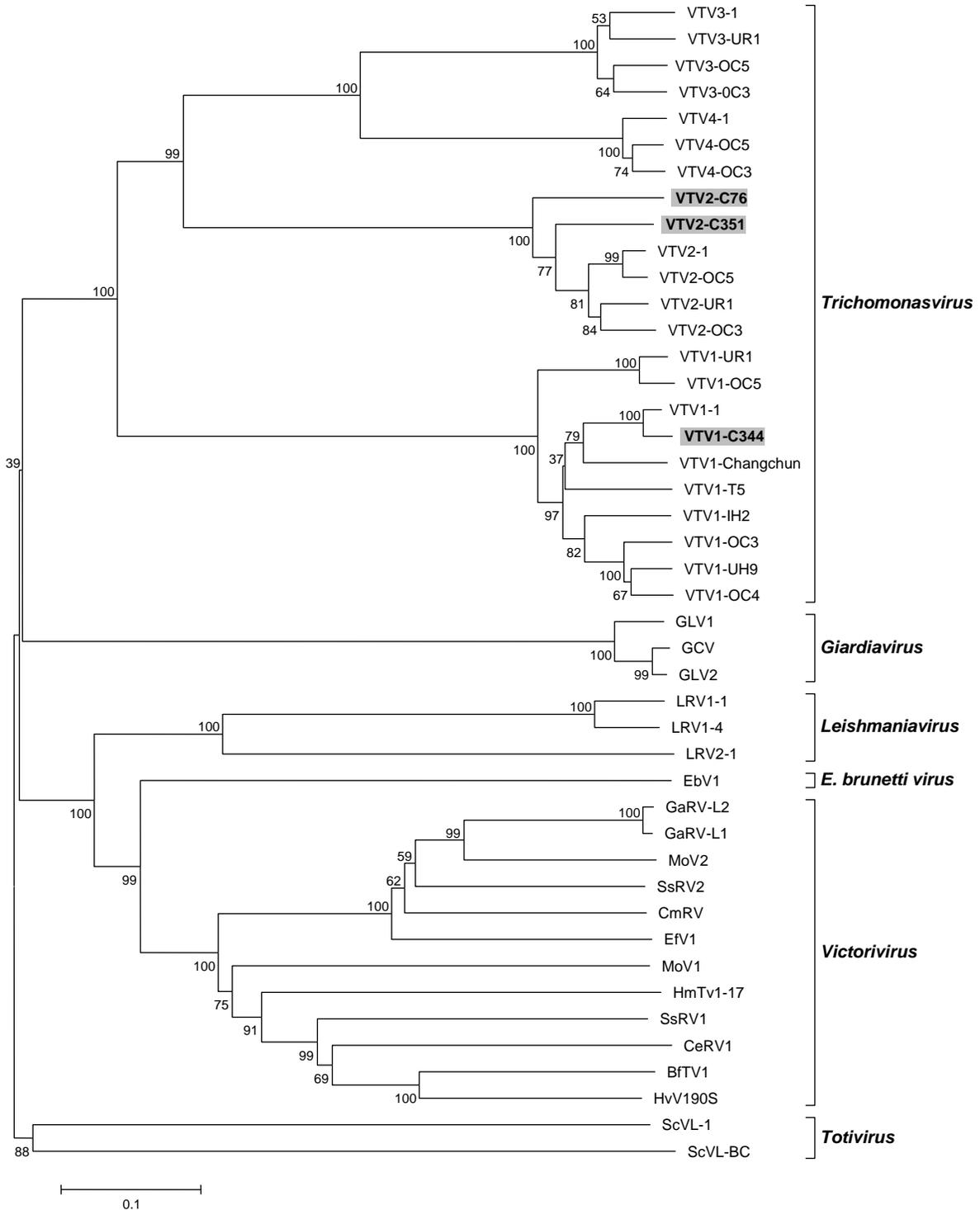
Diagonal: Distancia genética e identidad (%) dentro de cada grupo de VTVs

Los aislamientos de la especie VTV-2 se encuentran relacionados con las especies VTV-3 y -4. Por su parte los aislamientos de la especie VTV-4 están más relacionados con la especie VTV-3, que con la especie VTV-2.

En el árbol filogenético se observa como el aislamiento VTV-C344 se encuentra dentro del grupo de los aislamientos correspondientes a la especie VTV-1 (1-1, IH2, T5, Changhun, UH9, UR1, OC3, OC4 y OC5) con un valor de bootstrap de 100% y los aislamientos VTV-C76 y C351 se agrupan con los genomas correspondientes a la especie VTV-2 (2-1, UR1, OC3 y OC5), también con un alto valor de bootstrap (100%).

Todos estos grupos también se verificaron al utilizar los métodos de Máxima verosimilitud (Figura 9), Evolución Mínima (Anexo 7) y Máxima Parsimonia (Anexo 8) lo que indica que los grupos obtenidos son robustos y no dependen del modelo evolutivo seleccionado para la construcción del árbol filogenético.

Las redes filogenéticas obtenidas al utilizar las mismas secuencias que la Figuras 8 y 9 se muestran en la Figura 10. Los grupos que se identificaron al utilizar el análisis filogenético convencional también se obtuvieron por el análisis de las redes. Al interior del grupo de aislamientos de VTVs quedaron bien definidos los 4 grupos que se correspondieron con las especies VTV-1, 2, 3 y 4.



**Figura 8.** Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de CP y RdRp de los VTVs y otros miembros de la familia *Totiviridae* (listados en el Anexo 4) obtenido por el método de Unión al Vecino. En negritas se destacan las secuencias de VTVs que se informan en este trabajo. Los valores sobre las ramas son los valores **bootstrap**.

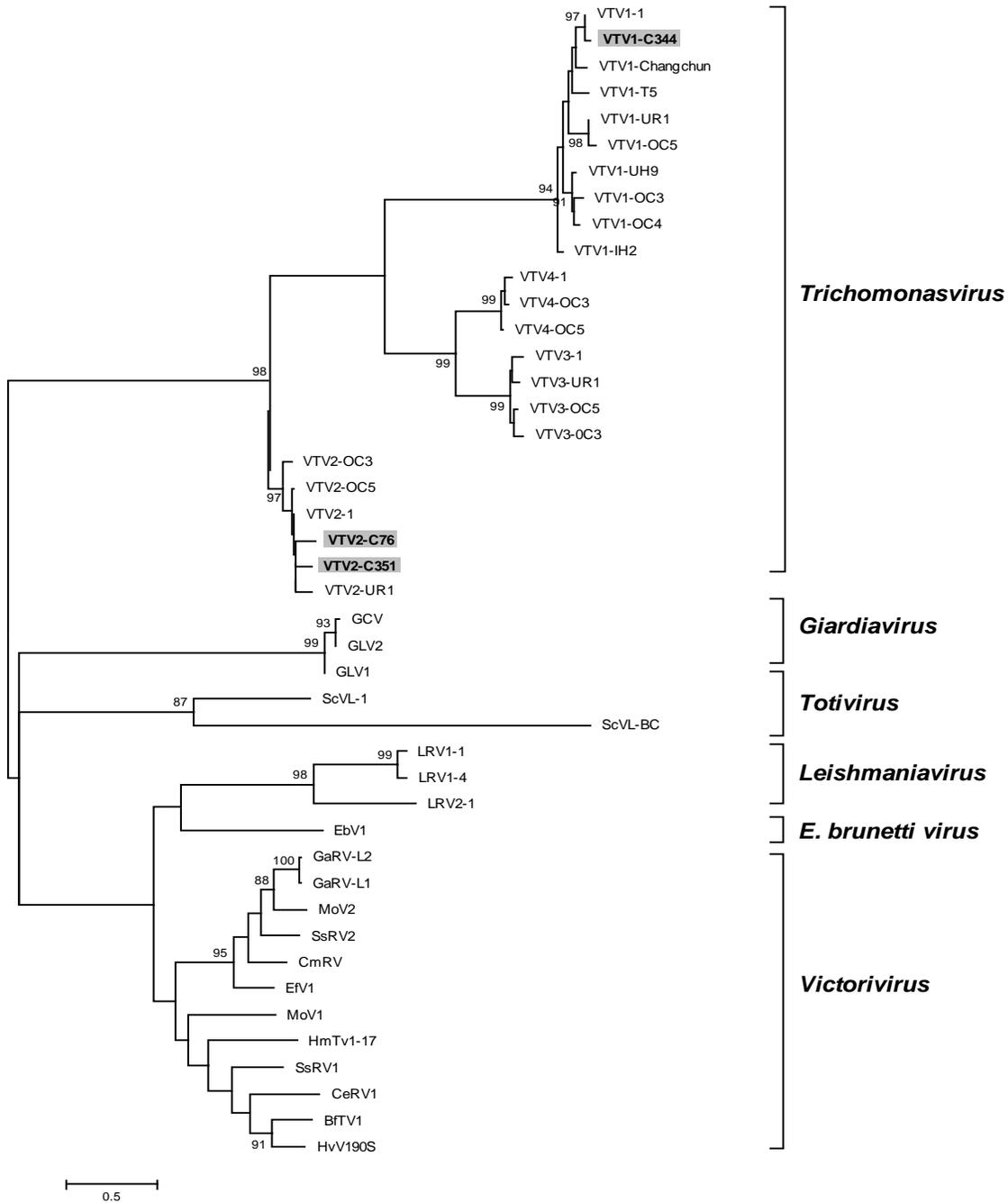


Figura 9. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de CP y RdRp de los VTVs y otros miembros de la familia *Totiviridae* (listados en el Anexo 4) obtenido por el método de Máxima Verosimilitud. En negritas se destacan las secuencias de VTVs que se informan en este trabajo. Los valores sobre las ramas son los valores bootstrap.

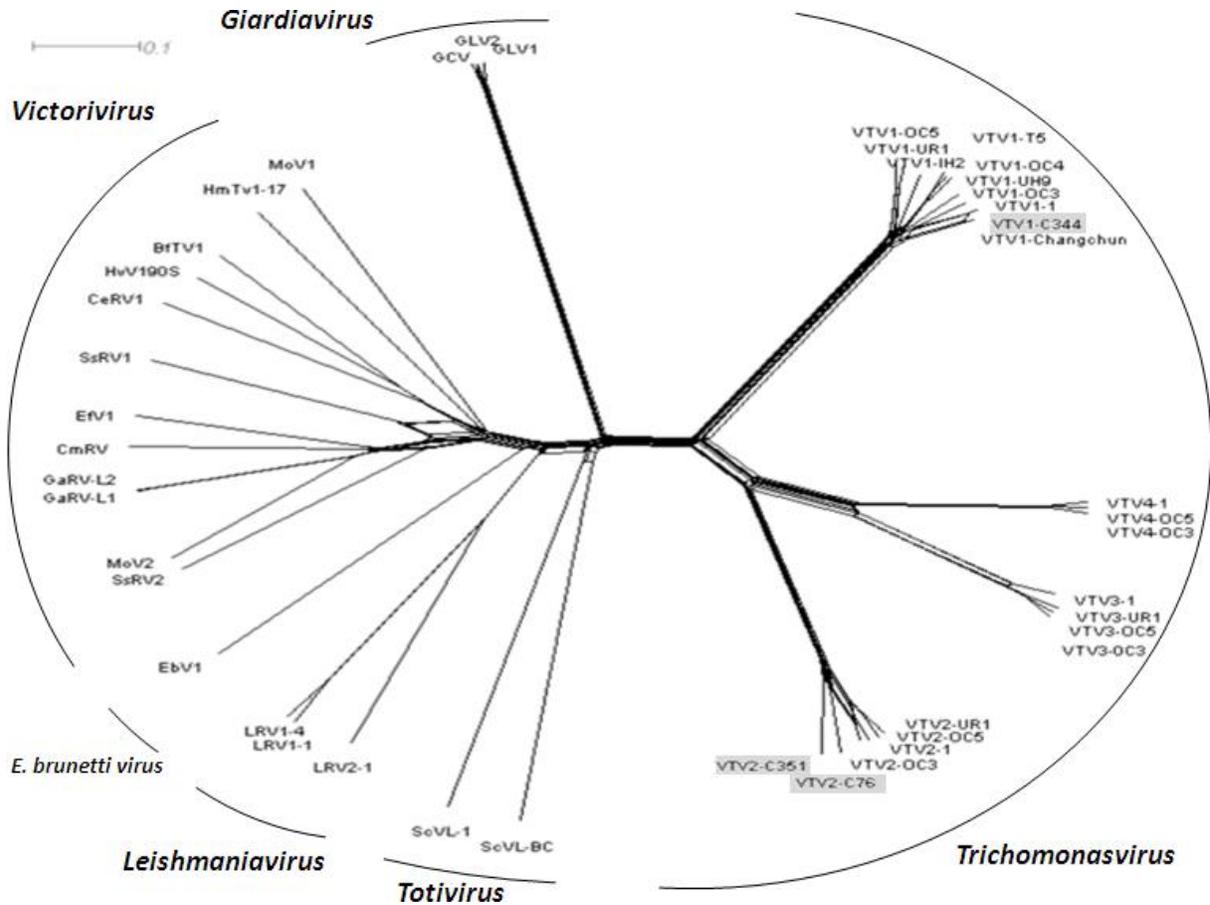


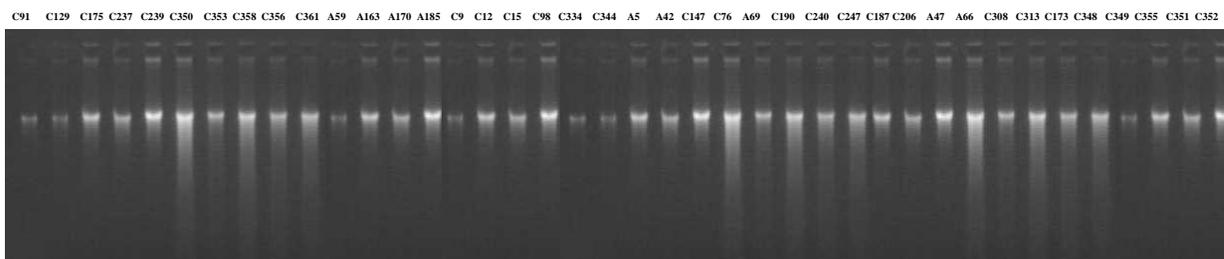
Figura 10. Red filogenética de las secuencias aminoacídicas de CP y RdRp de los VTVs y otros miembros de la familia *Totiviridae* mostrados en el Anexo 4, obtenidos por el método de Red de Unión al Vecino (NeighborNet).

#### 4.4. Análisis del polimorfismo genético de los aislamientos de *T. vaginalis* mediante la técnica del RAPD y su asociación con la presencia de VTVs

##### 4.4.1. Extracción de ADN genómico de aislamientos de *T. vaginalis*

En la Figura 11 se observa el ADN extraído de todos los aislamientos. Como podemos observar el ADN se obtuvo con buena calidad, pureza y concentración y no se observó degradación ni contaminación con ARN. Además, se demostró que el ADN está libre de inhibidores de la RCP, al utilizar algunos de los ADN aislados como molde en la reacción del RAPD. En todos los casos se obtuvieron patrones de bandas (datos no mostrados). El ADN

obtenido de cada uno de los aislamientos se utilizó para la detección de especies de la clase *Mollicutes* y la caracterización genética mediante la técnica del RAPD.



**Figura 11.** Electroforesis que muestra el ADN genómico de los 40 aislamientos de *T. vaginalis* separados mediante electroforesis en gel de agarosa a 0,8 % y visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta. En cada carril se representa el aislamiento de *T. vaginalis*.

#### 4.4.2. Detección de especies de la clase *Mollicutes* en aislamientos de *T. vaginalis*

Tres de los 40 aislamientos analizados (7,5 %) fueron positivos a la clase *Mollicutes* (Figura 12). La RCP múltiple detectó *M. hominis* en los aislamientos C12 y A163. El aislamiento C147 fue positivo a la clase *Mollicutes*, sin embargo resultó negativo a las cuatro especies probadas (Figura 13). Estos 3 aislamientos, dos de ellos clasificados como sintomáticos y 1 como asintomático, se eliminaron de los análisis posteriores, pues la presencia de *Mycoplasma* u otras especies de bacterias pueden influir en la sintomatología de los pacientes, la adherencia y el polimorfismo genético de los aislamientos.



**Figura 12.** Detección por RCP de la clase *Mollicutes* en aislamientos de *T. vaginalis*. Carril MM: Marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA plus Ladder (MBI, Fermentas) (MM). CP1 y CP2: Control positivo *M. hominis* ATCC23114 y *U. urealyticum* ATCC27618, respectivamente. CN: Control Negativo de la RCP.

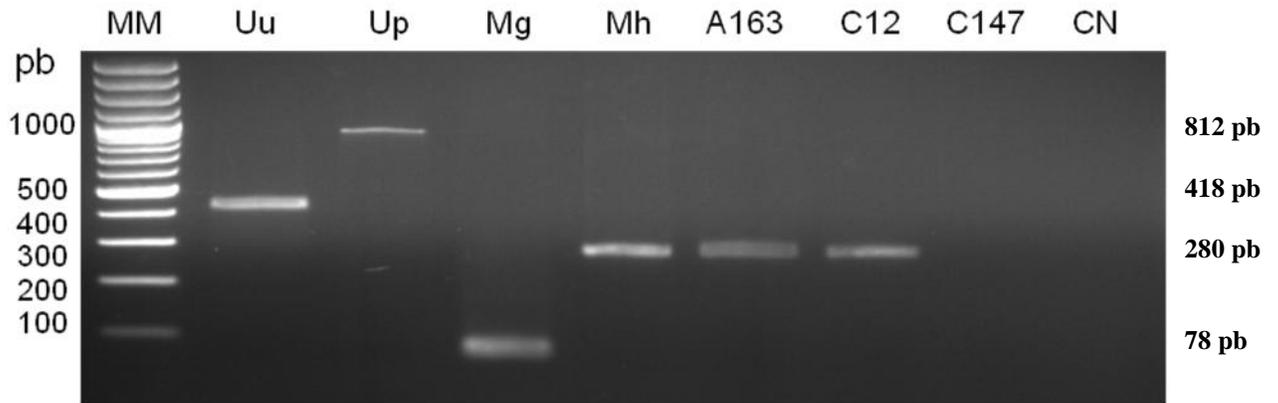
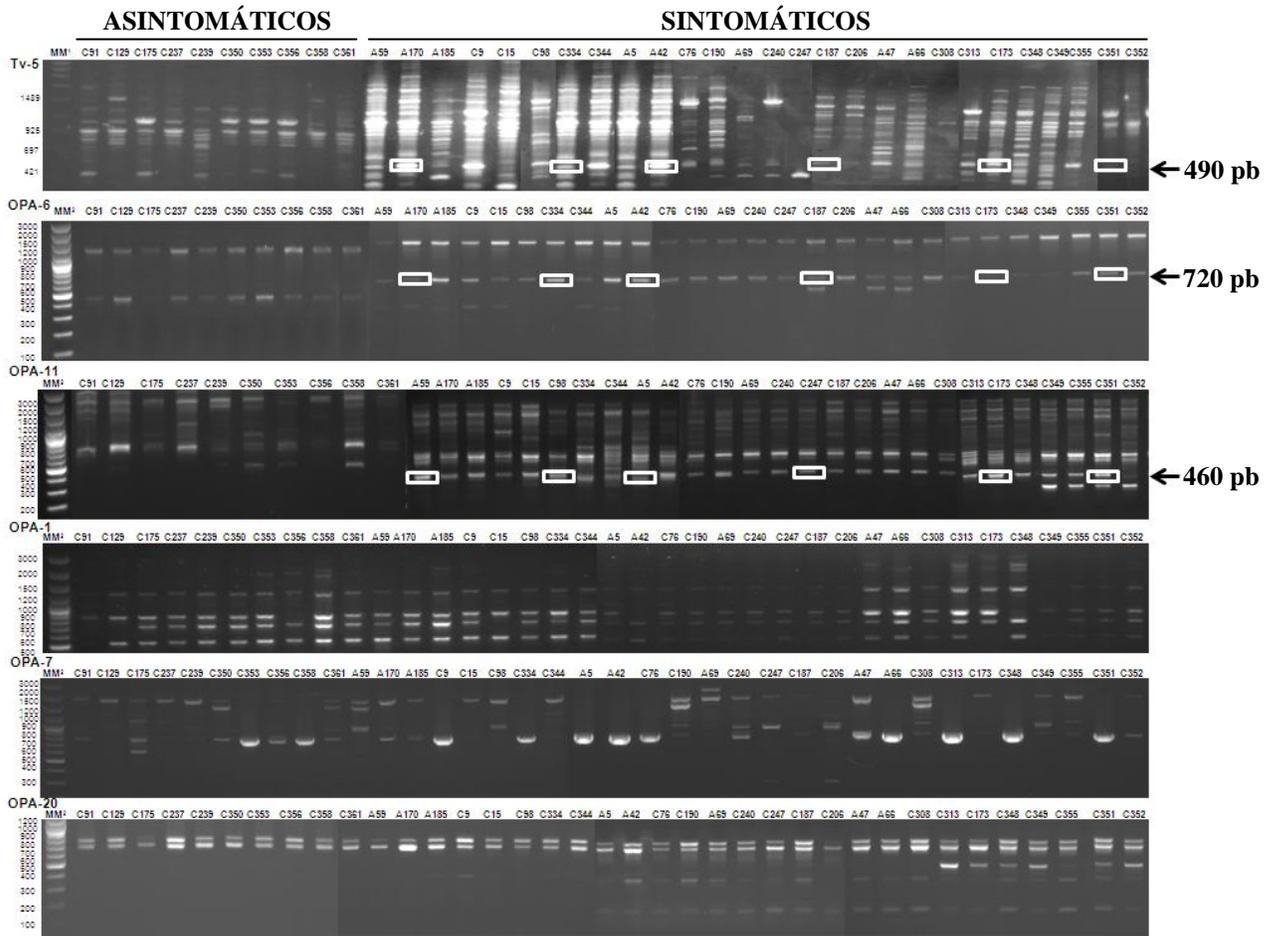


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RCP múltiple en aislamientos de *T. vaginalis* positivos a la clase *Mollicutes*. Carril MM: Marcador de Peso Molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder plus (MBI, Fermentas). Uu: *U. urealyticum* ATCC27618, Up: *U. parvum* ATCC2815, Mg: *M. genitalium* R32G y Mh: *M. hominis* ATCC23114, CN: Control Negativo de la RCP. A163, C12 y C147 aislamientos de *T.vaginalis*.

#### 4.4.3. Polimorfismo genético de los aislamientos y su asociación con la presencia de los VTVs

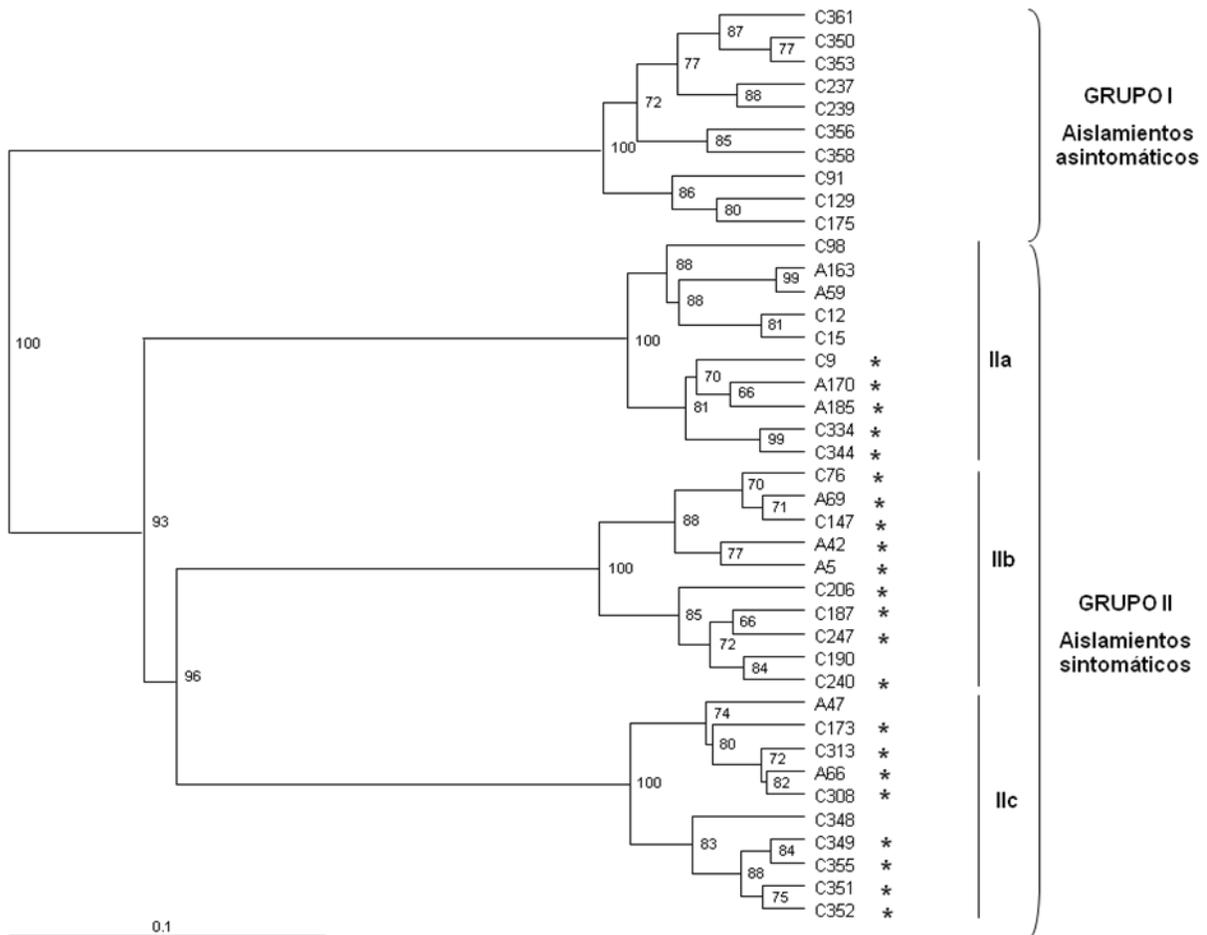
Para determinar la variabilidad genética entre 37 aislamientos de *T. vaginalis* se probaron 30 cebadores. Todos produjeron patrones distinguibles y reproducibles de fragmentos amplificados de ADN. De las 291 bandas reproducibles generadas por los treinta cebadores, que oscilaron entre 100 a 3000 pb, 257 bandas mostraron polimorfismo entre los 37 aislamientos analizados y sólo 34 se encontraron presentes en todos los aislamientos. El número medio de bandas amplificadas por cebador analizado fue de 9,7.

Los perfiles de RAPD, obtenidos con 6 cebadores (Tv-5, OPA-1, 6, 7, 11 y 20), de los 30 estudiados, se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Patrones de bandas de RAPD obtenidos al utilizar los cebadores Tv-5, OPA-1, 6, 7, 11 y 20. MM<sup>1</sup>: Marcador de peso molecular 1 kb (Promega, EUA). MM<sup>2</sup>: Marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA ladder (MBI, Fermentas). Se señala en cada gel el cebador utilizado. Se señala el aislamiento utilizado en cada carril. Las flechas indican los marcadores genéticos de RAPD asociados a la virulencia encontrados con los tres cebadores. Encerrado en cuadrado los marcadores utilizados para la secuenciación.

El análisis por RAPD se utilizó para revelar el polimorfismo genético y las relaciones genealógicas entre los aislamientos de *T. vaginalis*. Sobre la base de los 291 caracteres se construyeron los árboles filogenéticos, mediante los métodos de UPGMA (Figura 16) y NJ (Figura 17). La media del valor de bootstrap del árbol construido al utilizar el método de UPGMA resultó ser 83,7 % y del construido por el método de NJ de 77 %.



**Figura 16.** Dendrograma de los aislamientos de *T. vaginalis* basados en los datos de RAPD. El árbol se construyó por el método de UPGMA. La matriz de distancia se calculó por el inverso del coeficiente de similitud de Jaccard. Los asteriscos designan los aislamientos con VTVs. Los valores sobre las ramas son los valores bootstrap.



clasificación clínica de las pacientes (Anexo 2). A partir de estos resultados se puede decir que los aislamientos infectados con VTVs están agrupados y separados de los no infectados y a su vez los aislamientos procedentes de pacientes sintomáticos se diferencian de los aislamientos de pacientes asintomáticos (Figura 16 y 17).

Los árboles basados en el análisis de RAPD muestran una asociación entre el polimorfismo genético de los aislamientos y la presencia de los VTVs ( $P = 0,028$ ) y la presencia de síntomas y signos en las pacientes ( $P < 0,001$ ) que en ambos casos resultó ser estadísticamente significativa.

#### **4.5. Caracterización de marcadores genéticos de RAPD asociados a la virulencia**

Durante el análisis del polimorfismo genético se obtuvieron tres marcadores asociados a la virulencia mediante la técnica de RAPD. Los cebadores Tv-5, OPA-6 y OPA-11 amplificaron fragmentos específicos de 490pb, 720pb y 460pb respectivamente, presentes en todos los aislamientos sintomáticos estudiados y ausentes en los aislamientos asintomáticos (Figura 15). Estas bandas se denominaron Tv-5<sub>490</sub>, OPA-6<sub>720</sub> y OPA-11<sub>460</sub>.

La secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de 6 aislamientos escogidos al azar (A170, C334, A42, C187, C173, C351) para cada marcador generó fragmentos de 466pb, 700pb y 440pb, respectivamente. Estas secuencias se introdujeron en el Banco de Genes con los códigos de acceso JQ699181, JQ699182, JQ699183.

La comparación de secuencias del marcador Tv-5<sub>490</sub>, muestra una similitud significativa con la secuencia nucleotídica de una proteína con repeticiones ricas en leucina de *T. vaginalis* con función desconocida hasta el momento, y con una proteína con repeticiones ricas en leucina de *Giardia lamblia*, que tiene como función ser un receptor para la entrada de los *Giardiavirus*.

Los marcadores OPA-6<sub>720</sub> y OPA-11<sub>460</sub> no mostraron similitud significativa con ninguna secuencia publicada en el Banco de Genes al presentar valores de E superiores a  $10^{-5}$  (Tabla 7).

**Tabla 7. Código de acceso de las secuencias nucleotídicas con las que cada marcador presenta similitud al utilizar el programa *Blastn*.**

Marcador	Secuencias nucleotídicas	E-valor
Tv-5 <sub>490</sub>	XM_001298269.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> G3 Familia de proteína con repeticiones ricas en leucina	1e-40
	XM_001707130.1 <i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 Proteína de repetición rica en leucina 1 proteína receptor de virus (GL50803_5795) ARNm, cds completo	6e-14
	AF310726.1 <i>Giardia intestinalis</i> WB proteína receptor de virus ARNm, cds completo	6e-14
	AF310725.1 <i>Giardia intestinalis</i> JH proteína receptor de virus ARNm, cds completo	2e-12
OPA-6 <sub>720</sub>	<i>Mesorhizobium opportunistum</i> WSM2075, genoma complete	3,3
	Secuencia parcial; proteína homeobox HoxC9bb (HoxC9bb)	3,3
OPA-11 <sub>460</sub>	<i>Pinnaspis uniloba</i> aislamiento D0542A genes de la citocromo oxidasa subunidad I (COI) y citocromo oxidasa subunidad II (COII) genes, cds parcial; mitocondrial	0,001
	<i>Acyrtosiphon pisum</i> UPF0402 proteína CG32590, variante transcrita 2 (LOC100162874), ARNm	0,014

*Blastn*: Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local de ADN.

E-valor: Es conocido como e-valor (*e-value*) de corte, y nos permite definir qué alineamientos queremos obtener de acuerdo a su significación estadística. Cuanto menor sea el valor de E, más significativo es un alineamiento.

El programa "ORF finder" reveló que la secuencia aminoacídica derivada del marcador TV-5<sub>490</sub> en el marco de lectura 1 contiene un ORF de 151 aminoácidos que comienza con el aminoácido leucina y termina con el aminoácido arginina. El análisis mediante *Blastp* del ORF mostró una identidad considerable con la proteína hipotética con repeticiones ricas en leucina, del genoma de *T. vaginalis* G3 (número de acceso XP\_001298270.1) (80,1 bits, E-value= 7e-15) así como con la proteína con repeticiones ricas en leucina, que es un receptor viral de *Giardia lamblia* (números de acceso EFO64871.1, AAL37119.1, AAL37120.1, XP\_001707182.1) (43,1 – 43,9 bits, E-value= 0,005-0,010). El resto de las secuencias no mostraron identidad significativa de los ORF con ninguna proteína informada en el Banco de Genes (Tabla 8).

**Tabla 8. Código de acceso de las secuencias aminoacídicas con las que cada marcador presenta identidad al utilizar el programa *Blastp*.**

Marcador	Secuencias aminoacídicas	E-valor
<b>Tv-5<sub>490</sub></b>	XP_001298270.1 Proteína hipotética. Familia de proteína con repeticiones ricas en leucina. <i>T. vaginalis</i> G3	7e-15
	EFO64871. Proteína con repeticiones rica en leucina 1. Proteína Receptor de Virus ( <i>G. lamblia</i> P15)	0,005
	XP_001707182. Proteína con repeticiones rica en leucina. Receptor viral. ( <i>G. lamblia</i> ATCC50803)	0,009
	AAL37119. Proteína receptor virus. <i>Giardia intestinalis</i>	0,009
	AAL37120. Proteína receptor virus. <i>Giardia intestinalis</i>	0,010
<b>OPA-6<sub>720</sub></b>	YP_002944810. Proteína hipotética Vapar_2924;	0,75
	XP_00182080022; Proteína CanA. <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	1,8
<b>OPA-11<sub>460</sub></b>	ZP_03013423. Proteína hipotética BACINT_00981. <i>Bacteroides intestinalis</i> .	0,19
	XP_001361629. <i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i> .	1,2

*Blastp*: Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local de aminoácidos.

E-valor: Es conocido como e-valor (*e-value*) de corte, y nos permite definir qué alineamientos queremos obtener de acuerdo a su significación estadística. Cuanto menor sea el valor de E, más significativo es un alineamiento.

#### **4.6. Asociación entre la presencia y especie de los VTVs con la adhesión de los aislamientos del parásito**

Al analizar los resultados de los niveles de citoadhesión de los aislamientos estudiados en relación con la infección viral, los valores medios de los conteos celulares de adhesión fueron mayores en el grupo de aislamientos obtenidos de pacientes infectados con VTVs que los que no lo estaban ( $P < 0,01$ ). De la misma forma las medianas de los conteos celulares de adhesión fueron mayores en el grupo de aislamientos obtenidos de pacientes infectados con VTV-2 que los que estaban infectados con VTV-1 ( $P < 0,01$ ). En función de cada uno de los grupos clínicos, la mediana de la adhesión de los aislamientos mostro diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (Prueba de Kruskal-Wallis,  $P = 0,0002$ ) (Tabla 9). Sin embargo al aplicar la prueba múltiple de comparación de Dunn's no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de adhesión entre los aislamientos leves y moderados ( $P > 0,05$ ), sin embargo si se encontró diferencias estadísticamente significativas

entre los niveles de adhesión de los aislamientos level y severos y entre los moderados y severos ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 9. Comparación de los valores de adhesión a células HeLa entre los aislamientos no infectados e infectados con VTVs, entre los infectados con VTV-1 y VTV-2 y entre los diferentes grupos clasificados en función de las manifestaciones clínicas de las pacientes.**

	Grupo de Estudio	No	Conteo de Células		Valor de <i>P</i>
			Mediana	(10-90 % percentiles)	
Infección con VTVs	VTV +	21	163 622	(96 625-325 492)	<b>0,0017<sup>a</sup></b>
	VTV -	16	61 700	(26 782-339 867)	
Especie de VTVs <sup>b</sup>	VTV-1	6	107 552	(92 575-142 492)	<b>0,0017<sup>a</sup></b>
	VTV-2	12	286 535	(124 541-327083)	
Clasificación clínica de los aislamientos	Leve	5	100 825	92 575- 115 279	<b>0,0002<sup>c</sup></b>
	Moderado	8	152 233	118 115- 244 289	
	Severo	8	307 242	254 459- 327 408	

<sup>a</sup> Prueba *U* de Mann-Whitney

<sup>b</sup> Solamente los aislamientos infectados con una especie de VTVs

<sup>c</sup> Prueba de Kruskal-Wallis

#### 4.7. Asociación entre la presencia de los VTVs y las manifestaciones clínicas de las pacientes

La tabla 10 muestra la asociación entre la presencia de VTVs en aislamientos de *T. vaginalis* y las manifestaciones clínicas de las pacientes. Se encontró mayor asociación en los aislamientos infectados con VTVs procedentes de pacientes con sintomatología clínica que en los no infectados, pues los 21 aislamientos que tenían virus se obtuvieron de individuos sintomáticos (100 %) mientras que de los 16 aislamientos no infectados por VTVs solo 6 (37,5 %) se obtuvieron de individuos sintomáticos ( $P < 0,01$ ).

Al realizar el análisis de correlación en función del tipo de las manifestaciones clínicas, encontramos que la leucorrea se presentó con una mayor frecuencia en los pacientes cuyos aislamientos estaban infectados con VTVs que en los no infectados ( $P < 0,01$ ). Lo mismo ocurrió al analizar la disuria (OR=4,7; IC=1,04- 21,78) ( $P < 0,05$ ), y el eritema cervical (OR=15,83; IC=2,68–93,33) ( $P < 0,01$ ). La aparición del síntoma dispareunia fue mayor en los pacientes cuyos aislamientos estaban infectados por VTVs que en los no infectados, lo que

por la prueba de Fisher ( $P < 0,05$ ) resultó estadísticamente significativo. Sin embargo, el valor de OR no fue significativo al ser el valor inferior del intervalo de confianza menor que uno. No se encontró asociación entre el resto de las manifestaciones clínicas estudiadas y la presencia de VTVs ( $P > 0,05$ ) estadísticamente significativa. No obstante, las pacientes con aislamientos infectados con VTVs tienden a presentar más prurito que los pacientes con aislamientos no infectados [9 (42,9 %) de 21 aislamientos vs 3 (18,9 %) de 16 aislamientos;  $P > 0,05$ ]. El eritema vulvar por su parte, tiende a ser más frecuente en pacientes con aislamientos infectados que en pacientes con aislamientos no infectados [4 (19,0 %) de 21 aislamientos vs 0 (0 %) de 16 aislamientos;  $P > 0,05$ ]. El eritema vaginal se presentó en 11 (52,4 %) de los 21 pacientes con aislamientos con VTVs y en 4 (25,0 %) de los 16 pacientes con aislamientos sin VTVs ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 10. Asociación entre la presencia de los VTVs en aislamientos de *T. vaginalis* y las manifestaciones clínicas de las pacientes.**

Signos y síntomas	Presencia VTVs (n=21)	Ausencia VTVs (n=16)	OR (IC 95 %)	P
<b>Manifestaciones Clínicas</b>				
<b>Sintomático</b>	21 (100 %)	6 (37,5 %)	Indefinido	0,0000*
<b>Asintomático</b>	0 (0 %)	10 (62,5 %)		
<b>Leucorrea</b>				
<b>Sí</b>	21 (100 %)	6 (37,5 %)	Indefinido	0,0000*
<b>No</b>	0 (0 %)	10 (62,5 %)		
<b>Disuria</b>				
<b>Sí</b>	11 (52,4 %)	3 (18,7%)	4,7 (1,04-21,78)	0,0387*
<b>No</b>	10 (47,6 %)	13 (81,3 %)		
<b>Dispareunia</b>				
<b>Sí</b>	7 (33,4 %)	0 (5,5 %)	Indefinido	0,0113*
<b>No</b>	14 (66,6 %)	16 (94,5 %)		
<b>Prurito</b>				
<b>Sí</b>	9 (42,9 %)	3 (18,8 %)	3,25 (0,70- 14,92)	0,1149
<b>No</b>	12 (57,1 %)	13 (81,2 %)		
<b>Eritema vulvar</b>				
<b>Sí</b>	4 (19,0 %)	0 (0 %)	Indefinido	0,0906
<b>No</b>	17 (81,0 %)	16 (100 %)		
<b>Eritema vaginal</b>				
<b>Sí</b>	11 (52,4 %)	4 (25,0 %)	3,30 (0,79 – 13,64)	0,0889
<b>No</b>	10 (47,6 %)	12 (75,0 %)		
<b>Eritema cervical</b>				
<b>Sí</b>	19 (90,5 %)	6 (37,5 %)	15,83 (2,68–93,33)	0,0010*
<b>No</b>	2 (9,5 %)	10 (62,5 %)		

\* Diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). OR: Oportunidad Relativa o razón de disparidad.

Según se muestra en la tabla 11, los aislamientos clasificados como sintomáticos leves solamente se encontraron infectados con la especie de VTV-1, sin embargo la especie de VTV-2 se presenta solamente en los aislamientos clasificados como severos y en la mayoría de los aislamientos clasificados como moderados.

**Tabla 11. Presencia de las especies de VTVs en los aislamientos de *T. vaginalis* agrupados según la clasificación clínica.**

<b>Clasificación clínica de los aislamientos</b>	<b>Total</b>	<b>VTV-1 No.</b>	<b>VTV-2 No.</b>
Asintomático	10	0	0
Leve	8	5	0
Moderado	9	1	4
Severo	10	0	8

# *DISCUSIÓN*

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Presencia y tipificación de VTVs en aislamientos cubanos de *T. vaginalis*

El genoma de los VTVs se describió inicialmente como un genoma compuesto por un segmento de ARNdc de 5,5 kpb (Wang y Wang, 1986). Investigaciones posteriores observaron diferentes segmentos de ARNdc en aislamientos de *T. vaginalis* infectados con virus. Khoshnan y Alderete (1993) describieron al menos tres segmentos de ARNdc con tamaños que oscilaban entre 4,3 y 4,8 kpb (Khoshnan y Alderete, 1993). Estos resultados sugieren la posible infección de este protozoo por diferentes tipos de virus, así como la naturaleza de estos segmentos de VTVs. Benchimol *et al.* (2002), observaron una población viral compuesta por partículas de virus de diferentes tamaños (33- 200 nm) y formas pleomórficas (filamentosa, cilíndrica y esférica) en aislamientos del parásito, lo cual confirmó la posibilidad de la infección con uno o distintos virus ARNdc (Benchimol *et al.*, 2002). El genoma de los VTVs codifica para una proteína de la cápside y una ARN polimerasa ARN dependiente (Tai e Ip, 1995; Bessarad *et al.*, 2000). Alderete *et al.* (2003) informaron la existencia de variaciones genéticas entre los genes de la proteína de la cápside de los diferentes virus, lo que podía explicar la diversidad de los virus de ARNdc (Alderete *et al.*, 2003).

En este estudio, al analizar la talla de los VTVs en los aislamientos de *T. vaginalis*, se encontraron fragmentos de ARNdc de aproximadamente 4,6 kpb en 22 de los 40 aislamientos analizados. La talla de estos fragmentos coincide con las descripciones realizadas por otros autores (Khoshman y Alderete, 1993; Weber *et al.*, 2003). Tai e Ip (1995) describieron aislamientos de *T. vaginalis* donde observaron la co-infección de pequeños ARNdc de 0,5 kpb con el genoma de VTVs de 4,6 kpb (Tai e Ip, 1995). Esta co-infección, sin embargo, no se observó en ninguno de los aislamientos estudiados en este trabajo.

El fragmento de ARNdc de aproximadamente 4,6 kpb que se observa en los aislamientos de *T. vaginalis* en el presente trabajo, se obtuvo al analizar tanto la preparación total de ácidos nucleicos mediante el método del fenol-cloroformo, como a partir de la purificación de los virus y su posterior extracción del ARNdc. Estos resultados coinciden con lo planteado por Benchimol *et al.* (2002) quienes demostraron que tanto la purificación de los virus a partir de aislamientos de *T. vaginalis* infectados, al utilizar el método del CsCl (Khosman y Alderete, 1993), como el análisis de la preparación total de ácidos nucleicos extraídos por el método del fenol-cloroformo, muestran bandas que migran de forma idéntica. Esto demuestra la utilidad del último método mencionado, como una herramienta certera y más sencilla para la detección de VTVs a partir de aislamientos del parásito (Benchimol *et al.*, 2002).

En el presente estudio, el nivel de infección con VTVs fue del 55 %, similar al informe inicial de Wang *et al.* (1987) quienes obtuvieron aproximadamente un 50 % de infección de los aislamientos clínicos del parásito (Wang *et al.*, 1987). Vanáčová *et al.* (1997) y Hampl *et al.* (2001b) informaron niveles de infección del 44,4 % cuando analizaron 20 aislamientos del parásito de diferentes orígenes geográficos (Vanáčová *et al.*, 1997; Hampl *et al.*, 2001b). Snipes *et al.* (2000) encontraron niveles de infección del 50 % con VTVs, al analizar 109 aislamientos del parásito en Estados Unidos (Snipes *et al.*, 2000). Otros estudios revelan altos niveles de infección (81,9 %), al analizar 72 aislamientos del parásito en Sudáfrica (Weber *et al.*, 2003), y 75 % en 28 aislamientos procedentes de Estados Unidos (Baltimore) (Wendel *et al.*, 2002). Recientemente, Conrad *et al.* (2012) informaron un nivel de infección del 40,8 % al analizar 130 aislamientos del parásito provenientes de diferentes orígenes geográficos (Estados Unidos, Taiwán, Italia, Sudáfrica y Australia). Este es el primer informe de VTVs en aislamientos de *T. vaginalis* en pacientes cubanos, en los cuales se indica el posible nivel de infección de aislamientos de parásitos con virus ARNdc.

Hasta el momento se han descrito e identificado cuatro especies de VTVs a partir de los resultados de la comparación de genomas y análisis filogenético, denominándose VTV 1, 2, 3 y 4 (Goodman *et al.*, 2011a,b). En este trabajo, solo 2 especies de VTVs (1 y 2) se encontraron presentes en los aislamientos. Este constituye el primer estudio de detección y tipificación de VTVs en América Latina y el Caribe, así como el primer estudio a nivel mundial que tipifica

un mayor número de VTVs, ya que hasta el momento solo 22 VTVs, procedentes de 9 aislamientos de *T. vaginalis* se han tipificado mediante técnicas moleculares (secuenciación y RT-RCP) (Tai e Ip, 1995; Su y Tai, 1996; Kim *et al.*, 2007; Bessarab *et al.*, 2000; 2011; Goodman *et al.*, 2011a).

De los 22 aislamientos infectados con VTVs, solo tres mostraron co-infección de las dos especies identificadas. La co-infección de aislamientos de *T. vaginalis* se ha publicado por diferentes autores (Bessarab *et al.*, 2000; Benchimol *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2011a). Recientemente, Goodman *et al.* (2011a) hallaron cuatro aislamientos infectados de manera estable con 1, 2, o 4 VTVs distintos (Goodman *et al.*, 2011a). De forma general solo cinco aislamientos se han informado con estas características (Bessarab *et al.*, 2000; Benchimol *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2011a). En este trabajo analizamos un mayor número de aislamientos de *T. vaginalis* (40 aislamientos), a pesar de estos resultados, consideramos que se debe evaluar un mayor número de aislamientos con el fin de corroborar si solo existe en nuestros aislamientos la presencia de estas dos especies o si existen también los VTVs 3 y 4.

## **5.2. Caracterización genética de tres aislamientos de VTVs y análisis filogenético de los VTVs y la familia *Totiviridae***

Hoy se conoce que los VTVs están constituidos por cuatro grupos genéticos (Goodman *et al.*, 2011a). En el presente trabajo identificamos y caracterizamos tres VTVs obtenidos de aislamientos cubanos de *T. vaginalis* procedentes de pacientes con diferente cantidad de síntomas y signos relacionados con la parasitosis.

Al realizar la caracterización molecular de los tres aislamientos secuenciados, al utilizar el genoma completo del virus y las predicciones de las proteínas CP y la RdRp se obtuvieron los siguientes resultados: El aislamiento VTV-C344 mostró alta identidad con los aislamientos de VTV-1, similares secuencias motivo, secuencias terminales conservadas e igual organización del gen con solapamiento CP-RdRp y se observó la presencia de un heptámero requerido para el corrimiento del marco de lectura ribosomal para la traducción de la RdRp, al igual que en el resto de los aislamientos de VTV-1. La secuencia genómica de los VTV-1 se secuenció con

anterioridad en ocho aislamientos de VTVs procedentes de diferentes países (Tai e Ip, 1995; Su y Tai, 1996; Kim *et al.*, 2007; Goodman *et al.*, 2011a).

Los aislamientos de VTV-C76 y C351, mostraron una alta similitud con las secuencias de los genomas de los VTV-2, secuencias motivos y terminales conservadas, las que han sido informadas previamente por Bessarab *et al.* (2000) y Goodman *et al.* (2011a). Los VTV-2 codifican para genes solapados CP y RdRp en la cadena positiva del ARN viral. Sin embargo, el genoma tiene la potencialidad de codificar dos genes adicionales (ORF3 y 4) que se muestran en el aislamiento VTV2-1. En los dos aislamientos estudiados se encuentran estos dos ORF, así como en tres nuevos aislamientos VTV-2 caracterizados y secuenciados por Goodman *et al.* (2011a). Hasta el momento no se ha mostrado identidad significativa con secuencias de proteínas del banco de genes (GenBank). La naturaleza básica de estas proteínas virales sugiere que puedan estar involucradas en la interacción con proteínas ácidas, ARN o ADN y en la regulación de alguna actividad celular (Bessarab *et al.*, 2000).

A partir de los resultados de la tipificación de los VTVs al utilizar la RT-RCP, la caracterización genética y las predicciones aminoacídicas antes del análisis filogenético, se demostró que los aislamientos escogidos para secuenciar corresponden a las dos especies que circulan entre los aislamientos estudiados.

El análisis filogenético de la familia *Totiviridae*, basado en las secuencias de proteínas deducidas de los genes CP y RdRp con 3 nuevas secuencias de VTVs, demostró la presencia de cuatro grupos monofiléticos en el árbol: un primer grupo corresponde con los VTVs, el segundo agrupa a los virus de los géneros *Victorivirus* y *Leishmaniavirus* junto con el virus *E. brunetti*, un tercero agrupa a los virus del género *Totivirus* y el cuarto el género *Giardiavirus*. En el segundo grupo, dos grupos principales se pueden distinguir, los géneros *Victorivirus* y *Leishmaniavirus*, el primero más cercanamente relacionado con *Leishmaniavirus* que con los virus de hongos y levaduras. Este resultado coincide con lo informado por Ghabrial y Nilbert (2009) y apoya la conclusión de que los virus de hongos en la familia *Totiviridae* son polifiléticos (Ghabrial y Nilbert, 2009). De acuerdo a nuestros resultados, los virus del género *Victorivirus* se encuentran divididos en dos subgrupos como se ha demostrado anteriormente

(Castón *et al.*, 2006; Ghabrial, 2008; Maejima *et al.*, 2008; Ghabrial y Nilbert, 2009). El virus ARN *E. brunetti* 1 (EbV1), se identificó en el árbol filogenético como un taxón independiente entre *Leishmaniavirus* y *Victorivirus*, más cercanamente relacionado a *Victorivirus*. Este hallazgo se informó por Ghabrial y Nilbert (2009), sin embargo este virus hoy se encuentra dentro del género *Totivirus*. A pesar de estos resultados, somos del criterio que otras secuencias de virus *Eimeria* deben ser analizadas desde el punto de vista filogenético, con el objetivo de corroborar estos resultados y proponer una nueva clasificación para esta especie (Ghabrial y Nilbert, 2009).

El análisis realizado sugiere que los VTVs constituyen un grupo monofilético distinguible de los otros virus de la familia *Totiviridae*. Estos resultados nos permiten sugerir que los VTVs deben ser agrupados en un género separado y no dentro del género *Giardiavirus*, como se asignó previamente, basado en las relaciones de *Trichomonas* y *Giardia* al presentar ambos el mismo hospedero (Catalogue of Life, 2007) y en un análisis filogenético previo, donde solo se analizaron 5 secuencias de VTVs y 3 secuencias de otros miembros de la familia *Totiviridae* (*Giardiavirus*, *Leishmaniavirus* y *S. cerevisiae*) (Kim *et al.*, 2007). La propuesta de recomendar su posición en un género separado está en concordancia con los estudios realizados recientemente por Goodman *et al.* (2011a,b) basados en el análisis filogenético de las secuencias CP y RdRp de 19 aislamientos de VTVs y además con el reciente análisis por el Comité Ejecutivo del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV) y la discusión abierta ([http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy\\_proposals\\_fungal1/m/fung02/3821.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy_proposals_fungal1/m/fung02/3821.aspx)), quienes tuvieron en cuenta las diferencias filogenéticas entre otras características distintivas de los VTVs, proponen clasificar a estos virus en un nuevo género, nombrado *Trichomonasvirus*. Esta propuesta no se ha aprobado aún por el CITV (Goodman *et al.*, 2011a,b), de ahí la necesidad de nuevas evidencias que corroboren este resultado, como las encontradas en la presente investigación.

En el análisis filogenético realizado en este trabajo, se observa que dentro de los VTVs, los aislamientos correspondientes a las especies VTV-3 y -4 aparecen más relacionados entre ellos que con los aislamientos de VTV-2, y a su vez los VTV-2, se encuentran relacionadas de forma más cercana filogenéticamente con ellos que con los aislamientos correspondientes a los

VTV-1. Estos últimos quedan bien separados del resto de las especies descritas (VTV-2, 3 y 4). Nuestros resultados coinciden con lo encontrado por Bessarab *et al.* (2011) y Goodman *et al.* (2011a,b). Se analizaron dos nuevas secuencias de VTV-2 y todos los virus de esta especie quedaron agrupados con alto valor de bootstrap. Este informe apoya la existencia de 4 subgrupos dentro de los VTVs, lo cual se corresponde con la clasificación de las especies (VTV 1, 2, 3 y 4). Los resultados obtenidos, donde los valores de distancia p resultaron superiores a 0,4 y los por ciento de identidad por debajo del 60 %, apoyan el hecho de que cada uno de estos grupos constituye una especie dentro de los VTVs. Los resultados presentados en este estudio contribuyen a la discusión general sobre el consenso taxonómico de los VTVs. Estudios futuros que involucren un mayor número de aislamientos, especialmente de las especies 3 y 4, serán necesarios para completar la información relacionada con la filogenia de estas especies y determinar las relaciones filogenéticas y evolutivas dentro del género *Trichomonasvirus*.

### **5.3. Asociación entre el polimorfismo genético de los aislamientos de *T. vaginalis* y la presencia de los VTVs**

El polimorfismo genético entre los aislamientos de *T. vaginalis* se demostró al utilizar la caracterización antigénica, enzimática o los marcadores genéticos (Krieger *et al.*, 1985a; Proctor *et al.*, 1988; Vanáčová *et al.*, 1997; Ryu *et al.*, 1998; Snipes *et al.*, 2000; Stiles *et al.*, 2000; Hampl *et al.*, 2001a,b; Kaul *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2004a; Simões-Barbosa *et al.*, 2005; Upcroft *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2006; Meade *et al.*, 2009; Valadkhani *et al.*, 2011; Muzny *et al.*, 2012). La técnica del RAPD se utilizó para evaluar el polimorfismo genético de los aislamientos del parásito y su correlación con otras propiedades biológicas de los aislamientos, tales como: la susceptibilidad al metronidazol (Vanáčová *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 2000; Hampl *et al.*, 2001b; Xiao *et al.*, 2006), la presencia de *M. hominis* en aislamientos de *T. vaginalis* (Hampl *et al.*, 2001b; Xiao *et al.*, 2006) y las manifestaciones clínicas en las pacientes (Vanáčová *et al.*, 1997; Kaul *et al.*, 2004; Valadkhani *et al.*, 2011). Esta técnica se seleccionó para evaluar el polimorfismo genético de los aislamientos del parásito en el presente estudio y correlacionar el polimorfismo genético obtenido con la presencia de los VTVs y las manifestaciones clínicas de las pacientes.

A partir del conocimiento, de que cada día se hace más frecuente la concomitancia de varios agentes patógenos en el tracto urogenital y que la asociación y coexistencia de *T. vaginalis* con otros gérmenes causantes de ITS es bastante común, se plantea que *T. vaginalis* actúa como transportador de microorganismos. Este parásito se puede encontrar infectado naturalmente con otros virus y bacterias que igualmente afectan el tracto urogenital como son: VIH, *Papilomavirus* humano y *M. hominis* (Hernández *et al.*, 2009). Los dos primeros se analizaron previamente por nuestro grupo de trabajo (Rojas *et al.*, 2003), recientemente, se analizó la presencia de *Papilomavirus* humano en los 40 aislamientos estudiado la técnica de RCP, y no se encontró la presencia del virus en los mismos (Hernández 2011, comunicación personal), sin embargo, no había sido posible evaluar la presencia de *M. hominis* en estos aislamientos.

Diferentes estudios demostraron que la presencia de *M. hominis* en aislamientos de *T. vaginalis* influye significativamente en los resultados del RAPD y por consiguiente en la interpretación de los datos (Hampl *et al.*, 2001a; Xiao *et al.*, 2008). Hampl *et al.* (2001a) demostraron que la fiabilidad y robustez del dendograma, expresada en el valor medio de bootstrap, se incrementó significativamente al eliminar del estudio los aislamientos positivos a *Mycoplasma*, por su parte Xiao *et al.* (2008) demostraron un incremento significativo del número de bandas obtenidas por RAPD cuando está presente *Mycoplasma* en los aislamientos, lo que apoya que ese grupo de bandas está relacionado con la presencia de la bacteria y no con el parásito que se analiza. Todos estos resultados demuestran que para analizar con rigor el polimorfismo genético y su asociación con las manifestaciones clínicas de las pacientes y características biológicas de los aislamientos es necesario demostrar que los aislamientos no presenten *Mycoplasma*.

*M. hominis* infecta a *T. vaginalis* intracelularmente, se clasifica dentro de la clase *Mollicutes* que incluye además *Spiroplasma*s y *Acholeplasma*s. Esta bacteria se informó por primera vez que infectaba el parásito en 1975 (Nielsen y Nielsen, 1975). Recientemente, se informó que numerosos *Mycoplasmas* localizados dentro del parásito, pueden sobrevivir por períodos largos (Taylor-Robinson *et al.*, 1991; Baseman *et al.*, 1995; Dallo y Baseman, 2000; Rappelli *et al.*, 2001; Dessi *et al.*, 2005). Ambos, parásito y bacteria, comparten el mismo nicho natural específico, el tracto genitourinario. *Mycoplasma* spp. son pequeños microorganismos con un

genoma reducido, a menudo dependiente del hospedero para su supervivencia y multiplicación. *M. hominis* tiene la capacidad de entrar a las células de *Trichomonas* por endocitosis y se replican dentro del protozoo (Dessi *et al.*, 2005; Vancini y Benchimol, 2008). Este hallazgo sugiere que esta simbiosis pudiera proporcionar a la bacteria, durante la infección humana, la capacidad de resistir al estrés ambiental (Dessi *et al.*, 2005). Vancini y Benchimol (2008) informaron que el efecto citopático sobre las CEV se incrementa cuando los parásitos están infectados con *M. hominis*, en comparación con *T. vaginalis* libre de la bacteria (Vancini y Benchimol, 2008). No obstante, la contribución potencial de *Mycoplasma* sobre la trichomoniasis aún está por explorar.

En este trabajo solo encontramos tres aislamientos infectados con especies de la clase *Mollicutes*, dos de ellos infectados con *M. hominis*. El porcentaje de infección de *M. hominis* en la presente investigación fue de 5 %, lo que es bajo en comparación con otros estudios. Se han descrito en la literatura porcentos de co-infección entre *M. hominis* y *T. vaginalis* que oscilan entre un 20 % a más de 90 % (Rappelli *et al.*, 1998; Hampl *et al.*, 2001b; van Belkum *et al.*, 2001; van der Schee *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2010). Hampl *et al.* (2001b), encontraron un nivel de infección de 25 % cuando analizaron 20 aislamientos de diferentes orígenes geográficos (Hampl *et al.*, 2001b). En China, se describió un nivel de infección de alrededor de 50% al analizar 28 aislamientos (Fang *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2006). Otros estudios informan niveles superiores, alrededor de 75 % y 91 %, en el análisis de 14 aislamientos procedentes de Holanda y 35 de Italia, o de Angola y Mozambique (Rappelli *et al.*, 1998; van Belkum *et al.*, 2001; van der Schee *et al.*, 2001). Recientemente, Butler *et al.* (2010) informaron 20 % de infección en 55 aislamientos de Estados Unidos (Butler *et al.*, 2010). Este constituye el primer informe de infección de aislamientos cubanos de *T. vaginalis* con *M. hominis* y pudiera indicar un estimado del porcentaje de infección de la bacteria co-infectando el parásito en nuestro país.

Los tres aislamientos (C147, C12 y A163) que se encontraron positivos a la clase *Mollicutes* se eliminaron del análisis posterior, debido a la posible influencia en las manifestaciones clínicas de los pacientes, la adherencia del parásito y el polimorfismo genético de los aislamientos.

Hampl *et al.* (2001a,b), sugieren que el análisis repetido de bootstrap debe ser una parte obligatoria en cualquier estudio de RAPD. Esto permite evaluar la fidelidad del árbol filogenético obtenido y ajustar la cantidad de datos reunidos (el número a evaluar de cebadores al azar) a la cantidad de la señal filogenética en los datos de RAPD para el taxón que se analiza. Rojas *et al.* (2004b) analizaron los perfiles de RAPD de los mismos aislamientos que se estudiaron en nuestro trabajo con solo 10 cebadores e incluyeron aislamientos infectados con *M. hominis*. El valor medio de bootstrap en el árbol NJ resultó de 64,7 % y en el árbol UPGMA 60,6 %. (Rojas *et al.*, 2004b). En el presente estudio, la media de los valores de bootstrap en el árbol NJ fue 77 % y en el árbol UPGMA 83,7 %. Ambos valores resultaron superiores en comparación con el resultado previo obtenido por Rojas *et al.* (2004b) (Rojas *et al.*, 2004b). Cuando se aumenta de 10 a 30 el número de cebadores al azar analizados, y por esta razón, el número total de caracteres de RAPD binarios de 124 a 291, y se eliminan los aislamientos positivos a *M. hominis* el valor medio de bootstrap en ambos árboles se incrementa. Estos resultados apoyan la teoría propuesta por Hampl *et al.* (2011a,b), quienes le conceden gran importancia a la determinación del análisis repetido de bootstrap al utilizar la técnica del RAPD. El análisis de RAPD de 20 aislamientos de *T. vaginalis* de diferentes orígenes geográficos, estudiados por Hampl *et al.* (2001a,b), mostró bajos niveles de bootstrap (media bootstrap 38,7 % árbol NJ) (Hampl *et al.*, 2001a,b). Estos niveles bajos de bootstrap en las ramas de los aislamientos de *T. vaginalis* puede ser originado por la existencia del flujo de la información genética entre diferentes aislamientos de *T. vaginalis* (Hampl *et al.*, 2001a,b). Los niveles altos de bootstrap obtenidos en el presente trabajo y la presencia de una asociación significativa con algunas características biológicas (manifestaciones clínicas en las pacientes y la presencia de VTVs) y su distribución en el árbol filogenético, suponen que el árbol se acerca a la genealogía real de estos aislamientos y constituyen una evidencia para las asociaciones que se describen en esta investigación.

El presente estudio demostró la existencia de concordancia entre el polimorfismo genético y la presencia de los VTVs en los aislamientos del parásito. Algunos aislamientos tales como C98, A59, C15, A69, A47 y C348 fueron negativos a virus, pero se encuentran localizados dentro del grupo de aislamientos positivos a VTVs. Los aislamientos de *T. vaginalis* utilizados en este trabajo son organismos axénicos de menos de 10 pases posteriores al aislamiento. Es

posible que estos aislamientos presenten baja cantidad de virus, no detectadas por electroforesis en gel de agarosa ni RT-RCP, o puede que los parásitos hayan perdido los VTVs antes de ser aislados. Esta teoría se apoya en la observación de que los aislamientos de *T. vaginalis* pueden perder los virus después de sucesivos pases "in vitro" durante un prolongado período de tiempo (Wang *et al.*, 1987). En un estudio realizado por Shaio *et al.* (1993), se observó que en 12 aislamientos de *T. vaginalis*, 9 estaban infectados con VTVs y después de un tiempo prolongado en cultivo (mayor de 9 meses), 3 de ellos perdieron los virus durante el proceso continuo de pases, lo cual explica la posibilidad de que los aislamientos pueden perder los VTVs en determinadas condiciones (Shaio *et al.*, 1993). Sin embargo, la no detección de los virus en los aislamientos de *T. vaginalis* antes mencionados, no es indicativo que los mismos no presenten los genes involucrados en la entrada de los mismos, de ahí que no exista contradicción con la concordancia encontrada. Hoy no se conoce si los virus son habitantes naturales de *T. vaginalis*, o si son adquiridos a partir del hospedero en que el protozoo reside (Pindak *et al.*, 1989). Los estudios de asociación entre el polimorfismo genético y la presencia de los VTVs y la caracterización de marcadores genéticos relacionados con la presencia de VTVs podrían ayudar a dilucidar este planteamiento.

La correlación entre el polimorfismo genético de los aislamientos y la presencia de los VTVs que se encontró en el presente estudio, coincide con lo obtenido por Snipes *et al.* (2000) al utilizar la técnica de RAPD con 3 cebadores, en una población de 109 aislamientos. No obstante, Vanáčová *et al.* (1997) y Hampl *et al.* (2001b) no encontraron correlación entre el polimorfismo genético de los aislamientos y la presencia de los VTVs posiblemente debido a la composición de los aislamientos analizados y el bajo número de aislamientos que se estudiaron (20 aislamientos de varios continentes). Resultados similares se describieron por Hussien *et al.* (2005) quienes no encontraron asociación entre los subtipos del gen que codifica la proteína HSP70 determinados por RFLP, en 20 aislamientos egipcios de *T. vaginalis*; en este caso la técnica molecular utilizada se limita al estudio del polimorfismo genético de un solo gen (*hsp70*) (Hussien *et al.*, 2005). Recientemente, Conrad *et al.* (2012) evaluaron de forma global la diversidad genética y estructura poblacional de *T. vaginalis* mediante la técnica de microsatélites y proponen que este parásito tiene una sola estructura poblacional que consiste en dos tipos que presentan igual proporción a nivel mundial. Sin

embargo los dos tipos de parásitos (1 y 2) difieren significativamente en la proporción en que ellos se encuentran infectados con VTVs, lo que demostró una asociación entre el polimorfismo genético y la presencia de VTVs como mismo sucedió en el presente estudio (Conrad *et al.*, 2012).

Los resultados de asociación, obtenidos entre el polimorfismo genético y la presencia de los VTVs, sugieren la posibilidad de que exista una predisposición genética que favorezca la adquisición y/o supervivencia de los VTVs dentro de los aislamientos de *T. vaginalis*. En otro parásito, *G. lamblia*, se identifican otros virus ARNdc denominados *Giardiavirus* (Wang y Wang, 1986). En el curso de la infección de los *Giardiavirus* se revela que estos virus penetran por endocitosis a las células susceptibles del hospedero, donde el lisosoma, como vacuolas periféricas actúa como puerto de traslocación para que el virus alcance el citoplasma (Tai *et al.*, 1993). En otro estudio, Sepp *et al.* (1994) propusieron que la infección por *Giardiavirus* es mediada por endocitosis a través de un receptor en *G. lamblia*. Se piensa que este receptor putativo esté presente en la superficie de las células susceptibles al virus y sea el responsable de la unión e internalización de los *Giardiavirus*, pero esté ausente en las células resistentes (Sepp *et al.*, 1994). Estudios futuros son esenciales para demostrar la vía y las moléculas que pudieran estar involucradas en la entrada de los VTVs al parásito y su correlación con los aislamientos susceptibles y resistentes a la infección con VTVs.

En un informe previo realizado por nuestro grupo de trabajo, al utilizar la técnica de RAPD, se describió la asociación entre el polimorfismo genético de los aislamientos y las manifestaciones clínicas de las pacientes, al utilizar un total de 10 cebadores al azar (Rojas *et al.*, 2004a). En el presente estudio analizamos el polimorfismo genético en el mismo grupo de aislamientos pero con un mayor número de cebadores al azar y corroboramos la asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo genético y las manifestaciones clínicas de las pacientes. Kaul *et al.* (2004) examinaron igualmente la posibilidad de diferenciar aislamientos de mujeres sintomáticas y asintomáticas mediante la técnica de RAPD y encontraron que los aislamientos sintomáticos formaron dos grupos diferentes, uno de los cuales se separa claramente de los aislamientos de mujeres asintomáticas (Kaul *et al.*, 2004). Por su parte, Meade *et al.* (2009), informaron la diversidad genética de los aislamientos de *T.*

*vaginalis* mediante la técnica de RFLP del gen *hsp70* citoplasmática y propusieron que los aislamientos de parásitos se organicen en dos linajes clonales, no obstante, los autores no correlacionaron el análisis filogenético con las manifestaciones clínicas u otras informaciones fenotípicas, tales como la sensibilidad al metronidazol, o la presencia de VTVs (Meade *et al.*, 2009). Recientemente, Valadkhani *et al.* (2011), al analizar 40 aislamientos procedentes de pacientes iraníes sintomáticos y asintomáticos encontraron que sus aislamientos se dividían en dos grupos importantes y las diferencias entre aislamientos sintomáticos y asintomáticos resultó ser estadísticamente significativa (Valadkhani *et al.*, 2011). Estos resultados corroboran el posible papel del parásito en la virulencia.

#### **5.4. Caracterización de marcadores genéticos de RAPD asociados a la virulencia**

Como resultado del análisis del polimorfismo genético de RAPD, se encontraron tres marcadores genéticos de virulencia. Recientemente, Valadkhani *et al.* (2011) informaron sobre la presencia de un marcador genético de virulencia de 1300 pb que solo se encontraba presente en la mayoría de los aislamientos asintomáticos. Sin embargo, este no ha sido caracterizado hasta el momento (Valadkhani *et al.*, 2011). Este constituye el único marcador genético asociado a la virulencia descrito con anterioridad al trabajo de nuestro grupo.

De los tres marcadores de virulencia encontrados, solo el marcador Tv-5<sub>490</sub> mostró una similitud significativa con secuencias publicadas en el Banco de Genes, en específico con dos proteínas: una proteína con repeticiones ricas en leucina de *T. vaginalis* (aislamiento G3) con función desconocida hasta el momento, y con una proteína con repeticiones ricas en leucina de *G. lamblia* que tiene como función ser receptor para la entrada de los *Giardiavirus*.

Las proteínas con repeticiones ricas en leucina constituyen un grupo de proteínas dentro de la familia de proteínas BspA, una de las tres principales familias de proteínas de superficie de *T. vaginalis* (BspA, GP63 y adhesión y otras) (Vogel y Chotia, 2006; Hirt *et al.*, 2007). Los genes de las proteínas BspA (TvBspA) constituyen la mayor familia que codifican para proteínas potenciales de superficie y comparten un tipo específico de repeticiones de leucina (LRR siglas en inglés leucine-rich repeat) que se denomina TpLRR, después de estudiarse en *Treponema pallidum* (Kajava *et al.*, 2002) y compartir identidad con las secuencias de

proteínas de BspA de *T. forsythensis* y LrrA de *Treponema denticola* (Ikegami *et al.*, 2004). LRR es un motivo versátil obligado que se encuentra en una gran variedad de proteínas y está relacionado con la interacción proteína-proteína (Kedzierski *et al.*, 2004). Las proteínas TvBspA podrían representar receptores que median endocitosis en varias proteínas del hospedero mediante el TpLRR, involucrado probablemente en la unión a ligandos (Noël *et al.*, 2010). *T. vaginalis* presenta más de 300 candidatos de proteínas de superficie que pertenecen al menos a diez familias con al menos un dominio transmembrana y comparten uno o más rasgos con otras superficies de proteínas de patógenos (Harp y Chowdhury, 2011). La identidad encontrada responde a una proteína cuya función hasta hoy no está totalmente determinada, la misma se corresponde con una familia de proteínas que está presente en la superficie del parásito por lo que podrían representar receptor celulares que median endocitosis.

El marcador de RAPD Tv-5<sub>490</sub> mostró además identidad con la proteína con repeticiones rica en leucina de *G. lamblia*, que tiene como función ser el receptor viral. En *G. lamblia*, se identificaron los *Giardiavirus* (Wang y Wang, 1986) y según se explicó con anterioridad estos virus entran al parásito por endocitosis. Sepp *et al.* (2004), al estudiar dos aislamientos de *G. lamblia* uno resistente y otro susceptible a la infección por *Giardiavirus*, demostraron la presencia de un componente de membrana con el cual interactuaba el virus en el aislamiento susceptible, pero, esto no sucedía en el aislamiento resistente, por lo que concluyeron que los aislamientos susceptibles presentaban un receptor viral el cual está ausente en los aislamientos resistentes. Los virus que se unen a estos receptores del parásito, son endocitados en vesículas dentro de la célula del hospedero y son liberados en el citoplasma, lugar donde ocurre la transcripción de los genomas del ARNdc y el ARN es encapsidado en el virión (Sepp *et al.*, 2004).

En este estudio se detectó la presencia de un gen que codifica para una proteína de superficie, que pudiera estar involucrada en la entrada de los VTVs, de la misma forma que ocurre en *G. lamblia*, al encontrarse similitud con el gen y el receptor en este parásito. Además, presenta alta identidad con la proteína de superficie de *T. vaginalis*. El análisis posterior de este gen permitirá determinar si está presente solamente en aislamientos susceptibles al virus o si existe

algún polimorfismo importante en el mismo gen de los aislamientos resistentes que permiten que el receptor cambie su estructura tridimensional e impida la entrada de los virus, o que determinados factores permitan la expresión del mismo en los aislamientos susceptibles. Cualquiera de estas teorías deberá ser estudiada en investigaciones futuras.

Este resultado, además del hallazgo encontrado de la asociación entre el polimorfismo genético y la infección de los aislamientos con VTVs demuestran el papel del parásito en la infección de *T. vaginalis* con VTVs. Además de aportar evidencias por confirmar, que los VTVs son adquiridos del hospedero en el que el protozoo reside y no habitante natural del parásito pudiéndose especular sobre el posible mecanismo de entrada de los VTVs al parásito.

### **5.5. Asociación entre la presencia y especie de los VTVs con la adhesión de los aislamientos de *T. vaginalis* y las manifestaciones clínicas**

No hay evidencias de que los VTVs alteren la virulencia de *T. vaginalis* (Weber *et al.*, 2003). Dado el conocimiento y la demostración de que la presencia de los VTVs pueden modular la traducción y expresión de las proteínas inmunogénicas del parásito, es posible que los mismos puedan influir en la virulencia de la infección con *T. vaginalis*, en las diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas de las pacientes portadoras de la enfermedad y en la adherencia del parásito al huésped (Goodman *et al.*, 2011a,b). Con el propósito de demostrar la relación entre la presencia de los VTVs y la virulencia del parásito, evaluamos la influencia de los virus en la adhesión de *T. vaginalis* a las células HeLa y las manifestaciones clínicas de las pacientes.

La adhesión de las *Trichomonas* a las CEV constituye un elemento importante en los mecanismos de patogénesis de este parásito (Alderete y Pearlman 1984; Alderete y Garza, 1985). La adherencia es esencial en la colonización y persistencia de este agente patógeno (Beachey, 1989) y puede jugar funciones importantes al proporcionar una superficie para la división celular y la citotoxicidad (Honigberg y Brugerolle, 1990). Rojas *et al.* (2004a) evaluaron la adherencia a las células HeLa de 40 aislamientos cubanos de *T. vaginalis*, y el nivel de adherencia fue directamente proporcional a la severidad de las manifestaciones clínicas de las pacientes de las cuales procedían los aislamientos (Rojas *et al.*, 2004a). En

general, la asociación entre la adhesión y la virulencia ha sido discutida por diferentes autores con resultados controversiales. Krieger *et al.* (1990b) informaron que la adherencia no está directamente relacionada con la virulencia, al observar que cepas aisladas de pacientes sintomáticos mostraron diferencias en su capacidad de adherirse a las células del hospedero (Krieger *et al.*, 1990b). Sin embargo, Escario *et al.* (1995) demostraron que los aislamientos que producían mayor virulencia en ratones, presentaron los mayores valores de adherencia (Escario *et al.*, 1995). Valadkhani *et al.* (2003) observaron diferencias significativas en la adhesión entre los aislamientos sintomáticos en comparación con los aislamientos asintomáticos en los primeros 15 min de incubación (Valadkhani *et al.*, 2003). Otros estudios demostraron una citoadherencia alta a las CEV en aislamientos procedentes de pacientes sintomáticos en comparación con aislamientos de pacientes asintomáticas (Yadav *et al.*, 2007). Estos autores informaron que la cisteína proteínasa de 30 kDa se asoció a la virulencia, al demostrar que la expresión de la proteína es más estable en aislamientos sintomáticos (Yadav *et al.*, 2007). Recientemente, Cuervo *et al.* (2008) encontraron que los parásitos con fenotipos altamente virulentos durante los ensayos de interacción con CEV se adhirieron y cambiaron a la forma ameboide más rápidamente. Sin embargo, los parásitos que mostraron una virulencia fenotípica baja desarrollaban un bajo nivel de adhesión y ausencia de transformaciones morfológicas (Cuervo *et al.*, 2008). De Jesús *et al.* (2009) identificaron seis cisteína peptidasas que se expresan de forma diferente entre aislamientos con alta y baja virulencia fenotípica (De Jesús *et al.*, 2009). Aún cuando estos estudios demuestran una posible asociación entre la adhesión y la virulencia de *T. vaginalis*, estudios futuros serán necesarios para dilucidar esta asociación.

En nuestros resultados, encontramos un mayor nivel de adhesión en los aislamientos de parásitos infectados con VTVs en comparación con los parásitos no infectados, por lo que podemos concluir que existe una posible asociación entre la presencia de los VTVs con la adhesión del parásito.

La presencia de los VTVs se correlaciona con la expresión de la proteína altamente inmunogénica P270 (Alderete *et al.*, 1986). Los parásitos infectados con virus alternan entre la expresión de la proteína P270 en la superficie y el citoplasma celular. La localización en la

superficie de la proteína P270 se relaciona con su fosforilación (Alderete *et al.*, 1992). Sin embargo, la presencia de la proteína P270 se asocia con la falta de las adhesinas en la superficie del parásito y por consiguiente estos aislamientos no pueden citoadherirse o parasitar las células del hospedero, solo los organismos del fenotipo negativo (ausencia de P270 en superficie) tienen la capacidad de la citoadherencia (Alderete *et al.*, 1986; 1987). Los resultados obtenidos en nuestro estudio contradicen los resultados descritos con anterioridad, ya que los aislamientos infectados con virus presentaron mayor adherencia a las células HeLa, de ahí que estudios futuros serán necesarios con vistas a esclarecer estos aspectos, en específico las relaciones entre la presencia de la proteína P270 en la superficie celular con la presencia de las adhesinas u otras proteínas de superficie involucradas en la adhesión a las células epiteliales del tracto genitourinario y la morfología del parásito.

Recientemente se observó que la expresión en la superficie de la proteína P270, se evidencia solamente en las células de *T. vaginalis* infectadas con las especies de VTVs 2 y 3, lo que sugiere que la transcripción de los genes P270 se regula probablemente por factores virales comunes a estas especies (Bessarad *et al.*, 2011). En nuestros resultados preliminares, encontramos un mayor nivel de adhesión en los parásitos infectados con VTV-2 en comparación con los parásitos infectados con VTV-1, lo que nos demuestra la importancia no solo del papel del virus en la adhesión del parásito sino también de la importancia de la especie de virus infectante, además a partir de los resultados obtenidos es posible relacionar de alguna manera la expresión en la superficie de la proteína P270 con la adhesión del parásito.

Otro elemento importante que no analizamos en nuestro estudio, el cual está relacionado con la infección de los aislamientos del parásito con VTVs, es la expresión diferencial cualitativa y cuantitativa de cisteíno proteinasas importantes para la citoadherencia, citotoxicidad y degradación de los componentes de membrana, relacionados igualmente con la infección del parásito, su patogenicidad y virulencia (Provenzano *et al.*, 1997).

Finalmente, al investigar el significado clínico de la infección de los aislamientos de *T. vaginalis* con VTVs ayudaría a comprender mejor el papel de la infección de aislamientos con VTVs en la patogenia de la trichomoniasis (Wendel *et al.*, 2002). Wendel *et al.* (2002)

informaron por primera vez la prevalencia de VTVs (a partir de la edad y el sexo), así como la asociación de las manifestaciones clínicas con la presencia o ausencia de VTVs. Los pacientes con aislamientos positivos a virus tenían mayor edad, que los pacientes con aislamientos negativos a virus. Se obtuvo una mayor prevalencia en los aislamientos infectados con virus en mujeres que en hombres. Con estos resultados, se trató de explicar algunos elementos de la cronicidad y manifestaciones clínicas de *T. vaginalis* en hombres y mujeres. Este constituye, además, el primer estudio descrito en la literatura donde se analiza el significado clínico de los aislamientos infectados con VTVs. Aunque la infección viral con VTVs no se asoció significativamente con la presencia de síntomas en las pacientes (presencia de leucorrea, prurito, disuria, irritación o dolor), constituyó una primera aproximación a esta asociación, ya que las pacientes con aislamientos con VTVs presentaron mayor irritación genital, dolor, prurito genital y leucorrea que las pacientes con aislamientos sin VTVs. La disuria por su parte, fue más frecuente en pacientes con aislamientos no infectados que en los aislamientos con virus, aunque debemos señalar que en este estudio el número de aislamientos analizados fue pequeño (28 aislamientos) (Wendel *et al.*, 2002). Recientemente, Malla *et al.* (2011), analizaron 30 aislamientos procedentes de la India, 15 procedentes de pacientes asintomáticos y 15 procedentes de pacientes sintomáticos, y se demostró la presencia de los VTVs en los 30 aislamientos, por lo que no se obtuvo asociación estadísticamente significativa entre las manifestaciones clínicas y la presencia de los VTVs (Malla *et al.*, 2011).

En nuestro trabajo, analizamos un mayor número de aislamientos del parásito (37 aislamientos), teniendo en cuenta no solo los síntomas, sino también los signos en las pacientes, y se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la infección con VTVs y las manifestaciones clínicas de las pacientes.

Al analizar la especie de los VTVs y su asociación con las manifestaciones clínicas de las pacientes, se pudo observar que los aislamientos clasificados como sintomáticos leves estaban infectados solamente con la especie de VTV-1, sin embargo, la especie de VTV-2 se presentó solamente en los aislamientos clasificados como severos y en la mayoría de los clasificados como moderados. A pesar de los razonamientos planteados consideramos que estudios futuros

que involucren un mayor número de aislamientos son necesarios para dilucidar el papel de la especie en la severidad de la infección.

En otro agente parasitario (*Leishmania*), en el que se detectó la presencia de virus ARNdc denominados *Leishmanivirus* se encontró asociación entre la infección de los parásitos con virus y las manifestaciones clínicas (Tarr *et al.*, 1988; Ogg *et al.*, 2003; Ives *et al.*, 2011). Ogg *et al.* (2003) estudiaron los niveles de infección con *Leishmanivirus* de 47 muestras de pacientes con leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania braziliensis* y trataron de correlacionar la presencia y cantidad de virus con los tipos de lesiones en los pacientes. Estos pacientes presentaban diferentes tipos de lesiones (cicatrices cutáneas, lesiones cutáneas en proceso de cicatrización, lesiones cutáneas activas y lesiones de la mucosa nasal). Los resultados obtenidos por estos autores, indicaron que posiblemente la infección de los parásitos con *Leishmanivirus* y la cantidad de estos pudiera estar en relación con la progresión de la enfermedad, no obstante, consideran de que otros estudios se necesitan para definir la relación causal definitiva entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad y la presencia de los virus ARNdc (Ogg *et al.*, 2003).

Recientemente, Ives *et al.* (2011), demostraron que en la leishmaniasis mucocutánea (LMC), la cual constituye una de las formas clínicas más severas de la leishmaniasis (Weigle y Saravia, 1996; Vergel *et al.*, 2006; Arévalo *et al.*, 2007), la presencia de *Leishmanivirus* en los aislamientos de *L. guyanensis* influyó en la severidad de la enfermedad. La unión del ARN viral a los receptores tipo Toll 3 produce la estimulación de citoquinas y quemoquinas que refuerzan la respuesta inflamatoria, por lo cual se exagera la LMC y provoca la persistencia del parásito (Ives *et al.*, 2011).

En otros microorganismos, se ha demostrado que los virus pueden codificar proteínas reguladoras que influyen en la expresión de algunos genes. En el caso del hongo patógeno de la castaña, *Endothia parasitica*, se informa la presencia de una proteína reguladora de la modulación de la expresión fenotípica de un número de propiedades asociadas a la virulencia en cepas infectadas con virus ARNdc (Nuss, 1992). Estos hallazgos, junto con lo descrito por Khoshman y Alderete (1994), quienes encontraron una acumulación de ARN mensajero P270

solamente en los aislamientos positivos a virus y la presencia de bajos niveles de esta proteína en los aislamientos negativos a virus, refuerzan que los VTVs pueden codificar proteínas reguladoras de la transcripción de genes de *T. vaginalis* como las proteínas P270, inclusive las cisteíno proteinasas, pero como es lógico esto necesita una verificación experimental.

Las consideraciones anteriores nos hacen pensar que los virus ARNdc que infectan los protozoos parásitos, parecen ser factores de virulencia de las enfermedades parasitarias, al estar relacionadas con las manifestaciones clínicas en los pacientes y la persistencia del parásito. Nuestros resultados, aportan elementos sobre el significado clínico de la infección de aislamientos de *T. vaginalis* con VTVs que pueden influir en los mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia ejercidos por el parásito para producir la enfermedad.

## **5.6. Discusión general**

En este trabajo se demostró por primera vez la presencia de los VTVs en 40 aislamientos cubanos de *T. vaginalis*, donde solo se encontró la presencia de las especies VTV-1 y 2. Solo 3 aislamientos se informaron co-infectados con las dos especies circulantes. El nivel de infección que informamos en el grupo de aislamientos estudiados, se corresponde con los estudios previos que se encuentran en la literatura (Wang *et al.*, 1987; Vanáčová *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 2000; Hampl *et al.*, 2001b; Wendel *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003, Conrad *et al.*, 2012). Este constituye el primer estudio de detección y tipificación de VTVs que se realizará en Cuba y en la región de América Latina y el Caribe y contribuye a los escasos estudios realizados a nivel mundial relacionados con la infección de estos virus en los aislamientos del parásito.

Una vez detectada la presencia de los VTVs en los aislamientos *T. vaginalis*, en tres de ellos se determinó el genoma completo de los VTVs lo que permitió realizar un estudio filogenético posterior donde se involucraron 23 secuencias genómicas completas de VTVs junto a las de 21 aislamientos de los cuatro géneros que forman la familia *Totiviridae*, constituyendo a nivel internacional el estudio filogenético más completo realizado hasta el momento. Según los resultados obtenidos, los mismos forman un grupo monofilético separado del resto de los miembros de la familia *Totiviridae* lo que apoya su clasificación como un género aparte.

Dentro del género se observan cuatro grupos monofiléticos bien separados que constituyen especies bien definidas. Los resultados obtenidos en esta investigación contribuyen a los estudios taxonómicos de los VTVs, al demostrar que los mismos deben pertenecer al género *Trichomonasvirus* como fue propuesto con anterioridad por Goodman *et al.*, (2011a,b).

Seguidamente, para evaluar el papel del parásito para la infección con los VTVs, evaluamos la asociación entre el polimorfismo genético del parásito y la infección con VTVs, lo que resultó ser estadísticamente significativo. Este resultado está en concordancia con lo que se informó previamente por otros autores (Snipes *et al.*, 2000; Conrad *et al.*, 2012) y demuestra la posible predisposición genética para la adquisición y/o supervivencia de los VTVs. Al caracterizar los marcadores genéticos de virulencia encontrados en esta investigación, informamos la presencia de un marcador genético de virulencia, que se corresponde con una proteína receptora, y pudiera estar relacionada con la entrada de los VTVs a *T. vaginalis*. Este constituye otro elemento que evidencia la participación del parásito en la infección con los VTVs y el hecho de que los VTVs son habitantes naturales del hospedero donde el parásito reside, pudiéndose especular sobre el mecanismo de entrada de los virus al parásito.

Finalmente, para determinar el papel de los VTVs en la virulencia del parásito, evaluamos la influencia de la presencia de los virus en la adherencia de los aislamientos a células HeLa y en las manifestaciones clínicas de las pacientes. Se demostró por primera vez a nivel internacional que los aislamientos infectados con VTVs presentan un mayor nivel de adhesión a células HeLa en comparación con los aislamientos no infectados. En particular, los aislamientos infectados con la especie VTV-2 presentan los mayores niveles de adhesión. De igual forma se demostró que la presencia de los VTVs estaba relacionada con las manifestaciones clínicas de las pacientes de las cuales proceden los aislamientos. Estos dos elementos demuestran que los VTVs son factores de virulencia que intervienen en la patogénesis de la trichomoniasis.

# ***CONCLUSIONES***

## VI. CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia de VTVs en aislamientos cubanos de *T. vaginalis*, solo se encontraron dos especies de VTVs (VTV-1 y 2), mostrándose en tres aislamientos una doble infección, lo que constituye el primer estudio de detección y tipificación de especies de VTVs.
2. Todos los análisis filogenéticos realizados confirman la monofilia de las especies del género *Trichomonasvirus* lo que posibilita el reconocimiento de este clado como un género válido dentro de la familia *Totiviridae*. Cuatro variantes genéticas (VTV 1-4) bien soportadas estadísticamente, se reconocen dentro del clado *Trichomonasvirus*.
3. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo genético de *T. vaginalis* y la infección con VTVs, lo que apunta a una predisposición genética para la entrada y/o supervivencia de los virus en dicho parásito.
4. Se demostró que la secuencia del marcador genético de virulencia Tv-5<sub>490</sub> tiene alta similitud con una proteína de superficie de *T. vaginalis* con repeticiones rica en leucina cuya función será un receptor viral para la entrada de los VTVs, pudiéndose especular sobre el mecanismo de entrada de los virus al parásito.
5. La presencia de los VTVs, de manera particular la especie VTV-2, está asociada a la adhesión de los parásitos a células HeLa, lo que demuestra la participación de los virus en la virulencia del parásito.
6. La fuerte asociación detectada entre la infección viral en los aislamientos de *T. vaginalis* y la presencia de síntomas y signos en las pacientes, es indicativo del posible significado clínico de la presencia de VTVs y demuestra su incidencia en la virulencia ejercida por el parásito.

# ***RECOMENDACIONES***

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios futuros que involucren un mayor número de aislamientos cubanos para determinar la presencia o no de las especies de VTVs 3 y 4, con el objetivo de complementar la información relacionada con la filogenia de estas especies y el papel de la especie en la virulencia del parásito.
2. Secuenciar el gen que codifica la proteína rica en leucina que constituye un posible receptor para la entrada de los VTVs a *T. vaginalis* en aislamientos procedente de pacientes sintomáticos y asintomáticos y evaluar el polimorfismo genético de este gen.
3. Diseñar un método de RCP cuyo fundamento sea la técnica de región amplificada caracterizada por una secuencia (SCAR, siglas en inglés sequence characterized amplified region) que permita detectar aislamientos procedentes de pacientes sintomáticos y asintomáticos utilizando como base la secuencia del marcador de RAPD de virulencia Tv-5<sub>490</sub>.

***REFERENCIAS***  
***BIBLIOGRÁFICAS***

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams DC, Anthony CD. Using randomization techniques to analyse behavioural data. *Anim Behav* 1996; 51: 733- 8.
- Addis MF, Rappelli P, Fiori P L. Host and tissue specificity of *Trichomonas vaginalis* is not mediated by its known adhesion proteins. *Infect Immun* 2000; 68: 4358-60.
- Alderete JF. Altering phenotype expression of two classes of *Trichomonas vaginalis* surface markers. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 408-12.
- Alderete JF. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1999; 67:4298-302.
- Alderete JF, Garza GE. Soluble *Trichomonas vaginalis* antigens in cell-free culture supernatants. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 13: 147-58.
- Alderete JF, Pearlman E. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br J Vener Dis* 1984, 60:99-105.
- Alderete JF, Garza GE. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect Immun* 1985; 50: 701-8.
- Alderete JF, Kasmala L, Metcalfe E, Garza GE. Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonal virulence determinants. *Infect Immun* 1986; 53: 285- 93.
- Alderete JF, Demes P, Gombosova A, Valent A, Yánoska A, Fabusova H, *et al.* Phenotype and protein/epitope phenotypic variation among fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1987; 55: 1037- 41.
- Alderete JF, Newton E, Dennis C, Engbring J, Neale KA. Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to a prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin* 1991; 67:220-5.

- Alderete JF, Arroyo DC, Dailey J, Engbring MA, Khoshnan L, Lehker MW. Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol Cell Biol* 1992; 1:173-202.
- Alderete JF, Arroyo R, Lehker MW. Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis*. *Methods Enzymol* 1995; 253:407-14.
- Alderete JF, Demés P, Gombosova A, Valente M, Fabusova M, Janoska A, *et al.* Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1998; 56: 2558-62.
- Alderete JF, Wendel KA, Rompalo AM, Erbeding EJ, Benchimol M, Chang TH. *Trichomonas vaginalis*: evaluating capsid proteins of ARNdc viruses and the ARNdc virus within patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Exp Parasitol* 2003; 103: 44-50.
- al-Salihi FL, Curran JP, Wang J. Neonatal *Trichomonas vaginalis*: report of three cases and review of the literature. *Pediatrics* 1974; 53: 196- 200.
- Altschuld SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389–402.
- Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J, Arroyo R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathol* 2000; 28:193-202.
- Ardalan S, Lee BC, Garber GE. *Trichomonas vaginalis*: the adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Exp Parasitol* 2009; 121: 300-306.
- Arévalo J, Ramírez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, *et al.* Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Inf Dis* 2007; 195:1846-51.
- Arroyo R, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 1989; 57:2991-7.
- Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 1992; 6: 853-62.

- Arroyo RA, González-Robles A, Martínez-Palomo C, Alderete JF. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* 1993; 7: 299-309.
- Atienzar F, Evenden A, Jha A, Savva D, Depledge M. Optimized RAPD analysis generates high quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *Biotechniques* 2000; 28: 52-4.
- Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, Carlton JM, Dommer J, Fischer S, *et al.* GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res* 2009;37:526-30.
- Bachmann L, Lewis I, Allen R, Schwebke J, Leviton L, Siegal H, *et al.* Risk and prevalence of treatable sexually transmitted diseases at Birmingham substance abuse treatment facility. *Am J Public Health* 2000; 155: 676–9.
- Bardakci F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol* 2001; 25:2185-96.
- Baseman JB, Lange M, Criscimagna NL, Giron JA, Thomas CA. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog* 1995; 19: 105-16.
- Bassam BJJ, Caetano-Anolles PM, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992; 38: 70-6.
- Beachey E H. Bacterial adherence. In: Switalski L, Hook M, Beachey EH (eds) *Molecular mechanisms of microbial adhesion*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1989. pp 1–4.
- Benchimol M, Pacheco S, Chang TH, Alderete JF. Virus in *Trichomonas*-an ultrastructural study. *Parasitol Int* 2002; 51: 293- 8.
- Bessarab IN, Liu HW, Ip CF, Tai JH. The complete cDNA sequence of a type II *Trichomonas vaginalis* virus. *Virology* 2000; 267: 350-9.
- Bessarab IN, Nakajima R, Liu HW, Tai JH. Identification and characterization of a type III *Trichomonas vaginalis* virus in the protozoan pathogens *Trichomona vaginalis*. *Arch Virol* 2011; 156: 285–94.
- Bonilha VL, Ciavaglia M, de Souza W, Costa e Silva Filho F. The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. *Parasitol Res* 1995; 81:121-6.

- Brown MT. Trichomonosis. Practitioner 1972; 209: 639- 44.
- Butler SE, Augostini P, Secor WE. *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from United State. Parasitol Res 2010; 107:1023-7.
- Buve A, Weiss HA, Laga M, Van Dyck E, Musonda R, Zekeng L, *et al.* The epidemiology of trichomoniasis in women in four African cities. AIDS 2001; 15: 89-96.
- Caetano-Anolles G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. PCR-Methods Appl 1993; 3: 85-94.
- Campbell WC. A historic photomicrograph of a parasite (*Trichomonas vaginalis*). Trends Parasitol 2001, 17:499-500.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, *et al.* Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science 2007; 315: 207–12.
- Carlton JMR, Howarrd J, Jense JB, Walliker D. A rapid technique for the detection of DNA polymorphisms in *Plasmodium*. Exp Parasitol 1995; 80: 163-6.
- Castón RJ, Luque D, Trus BL, Rivas G, Alfonso C, González JM, *et al.* Three-dimensional structure and stoichiometry of *Helminthosporium victoriae* 190S totivirus. Virology 2006; 347: 323–32.
- Catalogue of Life. Annual Checklist, Species 2000 & IT IS Catalogue of Life Hierarchy, Edition 1. 2007. <<http://data.gbif.org/datasets/resource/1542>>, 2009-08-06 (accessed thought CBGI data portal).
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. MMWR 2002; 51(No. RR-6):[inclusive page numbers].
- Chang JH, Kim SK, Choi IH, Lee SK, Morio T, Chang EJ. Apoptosis of macrophages induced by *Trichomonas vaginalis* through the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase that locates at downstream of mitochondria-dependent caspase activation. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38:638-47.
- Conrad M, Zubacova Z, Dunn LA, Upcroft J, Sullivan SA, Tachezy J, Carlton JM. Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. Mol Biochem Parasitol 2011; 175:30-8.

- Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, *et al.* Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1573. doi:10.1371/journal.pntd.0001573.
- Cornelius DC, Mena L, Lushbaugh WB, Meade JC. Genetic relatedness of *Trichomonas vaginalis* reference and clinical isolates. Am J Trop Med Hyg 2010; 83:1283-6.
- Cornelius DC, Robinson DA, Muzny CA, Mena LA, Aanensen DM, Lushbaugh WB, Meade JC. Genetic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates using Multilocus Sequence Typing. J Clin Microbiol 2012; Aug 1. [Epub ahead of print]
- Costa e Silva Filho F, de Souza W, Lopes JD. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:8042-6.
- Costa e Silva-Filho FC, Kasai S, Nomizu M, López LB, Melo-Braga MB, Rocha-Azevedo B, *et al.* How laminin-1 can be recognized by the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*: possible role played by the extracellular matrix glycoprotein in both cytoadhesion and cytotoxicity exerted by the parasite. Parasitol Int 2002;51:305-7.
- Cotch MF. Carriage of *Trichomonas vaginalis* (Tv) is associated with adverse pregnancy outcome. En: Program and abstracts of the 30<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1990: abstr 681. p. 199.
- Crucitti T, Jaspers V, Mulenga C, Khondowe S, Vandepitte J, Buvé A. Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia. PLoS One 2011; 31:e16310.
- Cuervo P, Cupolillo E, Britto C, González LJ, E Silva-Filo FC, Lopes LC, *et al.* Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. J Proteomics 2008; 71:109-22.
- D'Surney SJ, ShugartLR, Theodorakis CW. Genetic markers and genotypic methodologies: An overview. Ecotoxicology 2001; 10: 201-4.
- Dailey DC, Chang T, Alderete JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. Parasitology 1990; 101: 171- 5.

- Dallo SF, Baseman JB. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microb Pathog* 2000; 29:301-9.
- Daly JJ, Sherman JK, Green L, Hostetler TL. Survival of *Trichomonas vaginalis* in human semen. *Genitourin Med* 1989; 65:106-8.
- De Jesús JB, Cuervo P, Britto C, Saboia-Vahia L, Costa ESFF, Borges-Veloso A, *et al.* Cysteine peptidase expression in *Trichomonas vaginalis* isolates displaying high- and low- virulence phenotypes. *J Proteome Res* 2009; 8:1555-64.
- de Miguel N, Lustig G, Twu O, Chattopadhyay A, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9:1554-66.
- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, *et al.* Epi Info Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta, GA: Centers for Disease Control. 1994.
- Demes P, Gombosova A, Valent M, Janoska A, Fabusova H, Petrenko M. Differential susceptibility of fresh *Trichomonas vaginalis* isolates to complement in menstrual blood and cervical mucus. *Genitourin Med* 1988; 64:176-9.
- Dessi D, Delogu G, EmonteE, Catania MR, Fiori PL, Rappelli P. Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection. *Infect Immun* 2005; 73: 1180-6.
- Diakou A, Dovas CI. Optimization of random-amplified polymorphic DNA producing amplicons up to 8500 bp and revealing intraspecies polymorphism in *Leishmania infantum* isolates. *Anal Biochem.* 2001; 288: 195-200.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic culture of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 1978; 72: 431-432.
- Diamond ME, Dowhanick JJ, Nemerff ME, Pietras DF, Tu C, Bruenn JA. Overlapping genes in yeast double-stranded RNA virus. *J Virol* 1989; 63: 3983-90.
- Donné DIE. Animacules observes dans les matieres purulents et le produit des secretions des organes genitaux de l'homme et de la femme. *C R Acad Sci* 1836; 3:385- 6.

- Dyer B. Phylum Zoomastigina Class Parabasalia. En: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ, editores. Handbook of Proctista. Jones and Bartlett, Boston, Mass; 1990. pp. 252- 8.
- Eck RV, Dayhoff MO. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, MD. 1966.
- Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. Biotechniques 1993; 14: 214-7.
- El-Shazly AM, Al-Naggar M, Soliman M, el-Negeri HE, El-Neme AE, Handousa L, *et al.* A study on trichomoniasis and female infertility. J Egypt Soc Parasitol 2001; 31: 545- 53.
- Escario JA, Gomez Barrio A, Martinez Fernandez AR. The relationship of experimental pathogenicity in vivo with in vitro cytoadherence and cytotoxicity of 6 different isolates of *Trichomonas vaginalis*. Int J Parasitol 1995; 25: 999-1000.
- Engbring JA, Alderete JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. Microbiology 1998; 144: 3011-8.
- Engbring JA, O'Brien JL, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* adhesins display molecular mimicry to metabolic enzymes. Adv Exp Med Biol 1996; 408: 207-23.
- Fang SL, Xiao JC, Lun ZR. Detection of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* by PCR. Chin J Parasitol Parasit Dis 2006; 24: 144-5.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. J Mol Evol 1981; 17: 368-76.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985; 39: 783-91.
- Fernández Molina C, Latino MA, Zamora Martinez Y, Pellecchia M, Neve V, Llanes R, Macfarlane R, Balbo L. Desarrollo de un método de PCR-Múltiple para la identificación de *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Rev Argent Microbiol 2003; 35: 138-42.
- Fernández-Calienes A, Fraga J, Pointier JP, Yong M, Sanchez J, Coustau C, *et al.* Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. Acta Tropica 2004; 92: 83-7.

- Fichorova RN. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *J Reprod Immunol* 2009; 83: 185-9.
- Fiori P, Rappelli P, Rocchigiani AM, Cappuccinelli P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidences of functional pores formation on red cell membrane. *FEMS Microbiology Letters* 1993; 109: 13-8.
- Fitch WM. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *System Zool* 1971; 20: 406–16.
- Flegr J, Zaboř. PTPT, the freeware program for permutation testing concordance between phylogeny and the distribution of phenetic traits. *Acta Soc Zool Bohem* 1998; 61: 91-5.
- Fouts AC, Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*: a re-evaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 1980; 141: 137– 43.
- Fraga J, Rojas L, Sariego I, Sarria CA. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for its use in genetic studies of *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect Genet Evol* 2002, 2: 73-5.
- Fraga J, Rodriguez J, Fuentes O, Hernández Y, Castex M, González R, Fernández-Calienes A. Genetic variability of *Triatoma flavida* and *Triatoma bruneri* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) by RAPD-PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011; 53:19-24.
- Freeman M. Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu Rev Genet* 2008; 42:191-210.
- Garber GE, Bowie WR. The effect of *Trichomonas vaginalis* and the role of pH on cell culture monolayer viability. *Clin Invest Med* 1990; 13:71-6.
- Garber GE, Lemchuk-Favel L, Bowie W. Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1548-53.
- Garber GE, Lemchuk-Favel L, Rousseau R. Effect of beta-estradiol on production of the cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1991;29:1847-9.
- Garber GE, Lemchuk-Favel L. Association of Production of Cell Detaching Factor With the Clinical Presentation of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2415-7.
- Garber GE, Lemchuk-Favel LT. Analysis of the extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 1994; 80: 361-5.

- Garcia AF, Alderete J. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiol* 2007; 7: 116.
- Gardner WA, Culberson DE, Bennett BD. *Trichomonas vaginalis* in the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 110: 430–2.
- Ghabrial SA, Nilbert ML. Victorivirus, a new fungal virus in the family *Totiviridae*. *Arch Virol* 2009; 154: 373–379.
- Ghabrial SA. *Totiviruses*. In: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Encyclopedia of Virology* vol. 5, third ed. Elsevier, Oxford, 2008; pp. 163–74.
- Gilbert R, Elia G, Beach DH, Klaessig S, Singh BN. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infect Immunol* 2000; 68: 4200- 6.
- Gilllin FD, Sher A. Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1991; 34:268-73.
- Gómez RF, Macelo AM, Melo NM , Pena SDJ. *Leishmania (viannia) braziliensis*: genetic relationships between strain isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol* 1995; 80; 681-7.
- Goodman RP, Freret TS, Kula T, Geller AM, Talkington MWT, Tang- Fernandez V, *et al.* Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* concurrently infected by strains of up to four *Trichomonasvirus* Species (Family *Totiviridae*). *J Virol* 2011a; 85: 4258–70.
- Goodman RP, Ghabrial SA, Fichorova RN, Nibert ML. *Trichomonasvirus*: a new genus of protozoan viruses in the family *Totiviridae*. *Arch Virol* 2011b; 156: 171– 79.
- Grondstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 577-84.
- Gutierrez A, Pointier JP, Fraga J, Jobet E, Modat S, Pérez RT, *et al.* *Fasciola hepatica*: identification and molecular markers for resistance and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Exp Parasitol* 2003;105: 211-8.
- Hampl V, Pavlíček A, Flegr J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001a; 51:731–5.

- Hampl V, Vanáčová S, Kulda J, Flegr J. Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas vaginalis*. BMC Evol Biol 2001b; 48: 1- 11.
- Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: evaluation to execution. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011; 157:3-9.
- Heath JP. Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures: a study by light and scanning electron microscopy. Br J Vener Dis 1981; 57: 106-17.
- Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. Annu Rev Cell Dev Biol 2003;19: 397-422.
- Hernández HM, Sariago I, Sarracent J. Infección humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos. Rev Cub Obst Ginecol 2009; 35: 108-117.
- Hernández HM, Sariago I, Alvarez AB, Marcet R, Vancol E, Alvarez A, et al. *Trichomonas vaginalis* 62 kDa proteinase as a possible virulence factor. Parasitol Res 2011; 108: 241-5.
- Hirt RP, Noel CJ, Sicheritz-Ponten T, Tachezy J, Fiori PL. *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. Trends Parasitol 2007;23: 540-7.
- Honigberg BM, Brugerolle G. Trichomonads parasitic in humans. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1990.
- Honigberg BM, Volkmann D, Entzeroth R, Scholtyseck. A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donne and *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller). J Protozool 1984; 31:116-31.
- Howard J, Carlon JMR, Walliker D, Jensen JB. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in inheritance studies of *Plasmodium falciparum*. J Parasitol 1996; 82: 941-6.
- Hsiang T, Baillie DL. Comparison of the yeast proteome to other fungal genomes to find core fungal genes. J Mol Evol 2005; 60: 475-83.
- Huson DH. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. Bioinformatics 1998; 14: 68-73.
- Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol Biol Evol 2006; 23: 254-267.

- Hussien EM, El-Sayed HZ, El-Moamly AA, Helmy MM, Shaban MM. Molecular characterization of Egyptian *Trichomonas vaginalis* clinical isolates by HSP70 restriction fragment length polymorphism. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35:699-710.
- Icho T, Wickner RB. The double-stranded RNA genome of yeast virus L\_A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J Biol Chem* 1989; 264: 6717-23.
- Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun* 2004; 72: 4619-27.
- Irvine JW, North MJ, Coombs GH. Use of inhibitors to identify essential cysteine-proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 149: 45-50.
- Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, *et al.* *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 2011; 331:775-8.
- Jaccard P. Nouvelles resechers sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 1908; 44: 223-70.
- Johnston VJ, Mabey DC. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 56-64.
- Kajava AV, Kobe B. Assessment of the ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information. *Protein Sci* 2002; 11:1082-90.
- Kaul P, Gupta I, Sehgal R, Malla N. *Trichomonas vaginalis*: random amplified polymorphic DNA analysis of isolates from symptomatic and asymptomatic women in India. *Parasitol Int* 2004; 53: 255- 62.
- Kedzierski Ł, Montgomery J, Curtis J, Handman E. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004; 52:104-12.
- Khoshnan A, Alderete JF. Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus particle infecting *Trichomonas vaginalis*. *J Virol* 1993; 67: 6950- 5.
- Khoshnan A, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* with a double stranded RNA virus has up regulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol* 1994; 68: 4035-8.
- Kim JW, Chung PR, Hwang MK, Choi EY. Double-stranded RNA virus in Korean isolate IH-2 of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol* 2007; 45: 87-94.

- Klebanoff M, Carey C, Hauth J, Hillier S, Nugent RP, Thom EA, *et al.* Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 487–93.
- Klouman E, Massenga EJ, Klepp KI, Sam NE, Nkya W, Nlya C. HIV and reproductive tract infections in a total village population in rural Kilimanjaro, Tanzania: women at increased risk. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14: 163- 8.
- Krieger JN. Urologic aspects of trichomoniasis. *Invest Urol* 1981; 18: 411- 7.
- Krieger JN. Prostatitis syndromes: pathophysiology, differential diagnosis, and treatment. *Sex Transm Dis* 1984; 11:100-12.
- Krieger JN. Trichomoniasis en men: old issues and new data. *Sex Trasm Dis* 1995; 22: 83- 96.
- Krieger JN. Epidemiology and clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in men. En Honigberg BM, editor. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag; 1990. pp.235-45.
- Krieger JN, Poisson MA, Rein MF. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun* 1983;41: 1291-5.
- Krieger JN, Holmes KK, Spence MR, Rein MF, McCormack WM, Tam MR. Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and the indirect immunofluorescence technique. *J Infect Dis* 1985a;152:979-84.
- Krieger JN, Ravdin JL, Rein MF. Contact-dependant cytopathogenicity mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1985b; 50: 778-86.
- Krieger JN, Torian BE, Hom J, Tam MR. Inhibition of *Trichomonas vaginalis* motility by monoclonal antibodies is associated with reduced adherence to HeLa cell monolayers. *Infect Immun* 1990a; 58:1634-1639.
- Krieger JN, Wolner-Hanssen P, Stevens C, Holmes KK. Characteristics of *Trichomonas vaginalis* isolates from women with and without colpitis macularis. *J Infect Dis* 1990b; 161: 307- 11.
- Krieger JN, Verdon M, Siegel N, Holmes KK. Natural history of urogenital trichomoniasis in men. *J Urol* 1993; 149: 1455– 8.

- Kurth A, Whittington LH, Golden MR, Thomas KK, Holmes KK, Schwebke J. Performance of a new, rapid assay for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 2004; 42: 2940-3.
- Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, *et al.* Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factor for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. AIDS 1993; 7:95-102.
- Laga M, Alary M, Nzila N, Manoka A T, Tuliza M, Behets F, *et al.* Condom promotion, sexually transmitted disease treatment, and declining incidence of HIV-1 infection in female Zairian sex work. Lancet 1994; 344: 246-8.
- Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 2009; 77: 2703-11.
- Lee KE, Kim JH, Jung MK, Arie T, Ryu JS, Han SS. Three-dimensional structure of the cytoskeleton in *Trichomonas vaginalis* revealed new features. J Electron Microsc (Tokyo) 2009; 58:305-13.
- Lehker MW, Alderete JF. Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates. J Parasitol 1999; 85:976-9.
- Levi MH, Torres J, Winston A, Pina C, Klein RS. Comparison of the InPouch System [IP] to Diamonds modified medium [DMM] for the isolation of *Trichomonas vaginalis* [Tv]. In Abstracts of the 96 th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC,1996. abstr. C-110, pp.20.
- Lin AW. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. J Clin Microbiol 1998; 34: 870-6.
- Link W, Dixkens C, Singh M, Schwall M, Melchinger AE, Jaccard P. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. The Appl Gen 1995; 90: 27-32.

- Maejima K, Himeno M, Komatsu K, Kakizawa S, Yamaji Y, Hamamoto H, Namba S. Complete nucleotide sequence of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Arch Virol* 2008; 153: 389–91.
- Malla N, Kaul P, Sehgal R, Gupta I. The presence of ARNdc virus in *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic Indian women and its correlation with *in vitro* metronidazole sensitivity. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29:152-157.
- Mallinson DJ, Lockwood BC, Coombs GH, North MJ. Identification and molecular cloning of four cysteine proteinase gene from the pathogenic protozoon *Trichomonas vaginalis* . *Microbiology* 1994; 140: 2725- 35.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harber Laboratory Press. Cold Spring Harber. New York; 1990.
- Martín-Moreno JM, Banegas JR. Sobre la traducción del término inglés *odds ratio* como oportunidad relativa. *Salud Publica Mex* 1997; 39: 72-4.
- McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, *et al*. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis* 2007; 195:698-702.
- McGrory T, Garber GE. Mouse intravaginal infection with *Trichomonas vaginalis* and role of *Lactobacillus acidophilus* in sustaining infection. *Infect Immun* 1992; 60: 2375-9.
- McGrory T, Meysick KC, Lemchuk-Favel LT, Garber GE. The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* “in vitro”. *J Parasitol* 1994; 80: 50-4.
- Meade JC, de Mestral J, Stiles JK, Secor WE, Finley RW, Cleary JD, Lushbaugh WB. Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by EcoRI restriction fragment length polymorphism of heat-shock protein 70 genes. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 245–51.
- Mendoza-López MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Avila-González L, Ruíz-Tachiquín ME, Ortega Lopez J, *et al*. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 2000; 68: 4907-12.
- Micheli MR, Bova R, Pascale E, D’Ambrosio E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 1921-2.

- Minkoff A, Grunebaum AN, Schwarz RH, Feldman J, Cummings MC, Clark WL, *et al.* Risk factors for prematurity rupture of membranes: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *Am J Obstetric Gynecol* 1984; 150: 965- 72.
- Moodley P, Wilkinson D, Connolly C, Moodley J, Sturm W. *Trichomonas vaginalis* is associated with pelvic inflammatory disease in women infected with HIV. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 519- 22.
- Mount DW. Phylogenetic prediction. En: Mount DW, editor. *Bioinformatics. Sequence and genome analysis*. Cols Spring Harbor Laboratory, New York; 2001. pp. 238- 78.
- Muller M. *Trichomonas vaginalis* and other sexually transmitted protozoan infections. En: Holmes KK, Masrdh P, editores. *International Perspectives of neglected sexually transmitted diseases*. Hemisphere Publishing Corp., New York; 1983. pp. 113 - 24.
- Muller M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu Rev Microbiol* 1988; 42: 465- 88.
- Muralidharan K, Wakeland EK. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA-PCR. *Biotechniques* 1993; 14: 362-4.
- Musatovova O, Alderete JF. Molecular analysis of the gene encoding the immunodominant phenotypically is varying P270 protein of *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* 1998; 24: 223-39.
- Muzny CA, Rivers CA, Mena LA, Schwebke JR. Genotypic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates among women who have sex with women in sexual partnerships. *Sex Transm Dis* 2012; 39:556-8.
- Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA* 1979; 76: 5269–73.
- Nielsen MH, Nielsen R. Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donné interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1975; 83: 381-9.
- No l CJ, Diaz N, Sicheritz-Ponten T, Safarikova L, Tachezy J, Tang P, *et al.* *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* 2010; 11: 99.
- Nuss DL. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Micro Rev* 1992; 56: 561- 76.

- Ogg MM, Carrion R, de Carvalho AC, Mayrink W, Correa-Oliveira R, Patterson JL. Short report: Quantification of Leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 309- 13.
- Pace J, Urbankova V, Urbanek P. Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54: 247- 56.
- Paisarntantiwong R, Brockman S, Clarke L, Landesman S, Feldman J, Minkoff H. The relationship of vaginal trichomoniasis and pelvic inflammatory disease among women colonized with *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis* 1995; 22: 344- 7.
- Papp T, Vágvolgyi C, Kerényi Z, Nagy A, Micharlides TJ. DNA amplification polymorphisms of *Mucor piriformis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1997; 72: 167-73.
- Pavlíček A, Hrdá S, Flegr J. Free-Tree–freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 1999; 45: 97–9.
- Pelayo L , Fraga J, Nuñez FA, Mendoza D, Torres D, Finlay CM. Genetic characterization by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of 18 isolates of *Giardia lamblia* obtained from day care children. *Exp Parasitol* 2003; 104:162-6.
- Peterson KM, Alderete JF. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1982; 37:755-62.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:300-17.
- Piepho HP, Laidig F. A review of methods for cluster analysis of marker data. UPOV document BMT/47/7. UPOV, Genf. 1997.
- Pindak FF, Mora de Pindak M, Hyde BM, Gardner WA, Jr. Acquisition and retention of viruses by *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* 1989; 65:366-71.
- Preethi V, Mandal J, Halder A, Parija SC. Trichomoniasis: An update. *Trop Parasitol* 2011; 1: 73-5.
- Proctor EM, Naaykens W, Wong Q, Bowie WR. Isoenzyme patterns of isolates of *Trichomonas vaginalis* from Vancouver. *Sex Transm Dis* 1988; 15: 181-5.
- Prokopi M, Chatzitheodorou T, Ackers JP, Clark CG. A preliminary investigation of microsatellite-based genotyping in *Trichomonas vaginalis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105:479-81.

- Provenzano D, Alderete JF. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1995; 63:3388-95.
- Provenzano D, Khoshnan A, Alderete JF. Involvement of ARNdc virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Arch Virol* 1997; 142: 939- 52.
- Rappelli P, Addis MF, Carta F, Fiori PL. *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *Lancet* 1998; 352:1286.
- Rappelli P, Carta F, Delogu G, Addis MF, Dessi D, Cappuccinelli P, Fiori PL. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Arch Microbiol* 2001; 175: 70-4.
- Rein MF, Chapel A. Trichomoniasis, candidiasis, and the minor venereal disease. *Clin Obstet Gynecol* 1975; 18: 73-78.
- Rein MF, Muller M. *Trichomonas vaginalis* and trichomiasis. En: Holmes KK, editor. Sexually transmitted diseases, McGraw-Hill, New York; 1990. pp. 481–92.
- Rendon-Maldonado JG, Espinosa-Castellano M, González-Robles A and Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: “In vitro” pathogenesis of lactobacillus, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. *Exp Parasitol* 1998; 89:241-50.
- Rendon-Maldonado JG, Espinosa-Castellano M, Soler C, Torres JV, Martinez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: “in vitro” attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1 infected lymphocytes. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50: 43-8.
- Rodríguez N, Fernández C, Rodríguez I, Berdasquera D, Rivera J. PCR-Múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2007; 24: 152-6.
- Rojas L, Solano R, Sariego I. Frecuencia de Trichomonosis vaginal en mujeres supuestamente sanas. *Rev Cub Hig Epidemiol* 1999; 37: 66-70.
- Rojas L, Rodriguez ME, Sariego I, Sarria CA. Trichomonosis vaginal en un grupo de personas VIH positivas. *Rev Cub Med Trop* 2000; 52: 330- 2.
- Rojas L, Rodríguez ME, Sarría C, Sariego I, Fraga J. Frecuencia de infección por *Trichomonas vaginalis* en parejas con trastornos de la fertilidad. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54: 85-90.

- Rojas L, Izquierdo A, Sarría CA, Sario I, Fraga J. Comportamiento de la Trichomonosis vaginal en un grupo de adolescentes. *Rev Cub Med Trop* 2003; 55: 179- 84
- Rojas L, Fraga J, Sario I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. *Infections Genetics and Evolutions* 2004a; 4: 53- 8.
- Rojas L, Sario I, Fraga J, Sarría CA, Sarracent J, Sánchez L. Use of *in vitro* cytoadherence assays in the comparative study of the virulence of isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 2004b; 93: 332- 7.
- Rosenthal BM. Defining and interpreting intraspecific molecular variation. *Vet Parasitol* 2001; 101: 187- 200.
- Routhier E, Bruenn JA. Functions of conserved motifs in the RNA-dependent RNA polymerase of a yeast double-stranded RNA virus. *J Virol* 1998; 72: 4427-9.
- Ryan CM, de Miguel N, Johnson PJ. *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host-parasite interactions. *Essays Biochem* 2011; 51: 161-75.
- Ryu JS, Min DY, Shin MH, Cho YH. Genetic variance of *Trichomonas vaginalis* isolates by Southern hybridization. *Korean J Parasitol* 1998; 36: 207- 11.
- Rzhetsky A, Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol Biol Evol* 1992; 9: 945-67.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4:406-25.
- Sayed SA, el-Wakil HS, Kamel WM, Mahmoud MS. A preliminar study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. *J Egypt Soc Parasitol* 2002; 32: 167- 78.
- Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Review* 2004; 17: 794- 803.
- Schwebke JR, Morgan SC, Pinson GB. Validity of self-obtained vaginal specimens for diagnosis of trichomoniasis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1618-9.
- Sepp T, Wang AL, Wang CC. Giardavirus-resistant *Giardia lamblia* lacks a virus receptor on the cell membrane surface. *J Virol* 1994; 68: 1426-31.
- Shafir SC, Sorvillo FJ, Smith L. Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 37-45.

- Shao MF, Lin PR, Lee CS. Killing of *Trichomonas vaginalis* by complement-mediated lysis is not associated with the presence of *Trichomonas vaginalis* virus. *Int J Parasitol* 1993; 23:675-80.
- Shiflett AM, Johnson PJ. Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annu Rev Microbiol*. 2010; 64:409-29.
- Simoës-Barbosa A, Lobo TT, Xavier J, Carvalho SE, Leornadecz E. *Trichomonas vaginalis*: intrastrain polymorphisms within the ribosomal intergenic spacer do not correlate with clinical presentation. *Exp Parasitol* 2005; 110:108-13.
- Sneath PHA. Some thoughts on bacterial classification. *J General Microbiol* 1957; 17: 201-26.
- Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard B, Lehmann T, Secor WE. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3004-9.
- Sobel JD. Is there a protective role for vaginal flora? *Curr Infect Dis Rep* 1999;1:379-83.
- Sood S, Kapil A. An update on *Trichomonas vaginalis*. *Indian J Sex Transm Dis* 2008; 29: 8-14.
- Soper D. Trichomoniasis: under control or undercontrolled?. 2004; 190: 281-90.
- Sorvillo F, Kerndt P. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. *Lancet* 1998; 351: 213-4.
- Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. *Trichomonas vaginalis*, HIV and African-Americans. *Emerg Infect Dis* 2001;7: 927-32.
- Spiegel CA. Microflora associated with *Trichomonas vaginalis* and vaccination against vaginal trichomoniasis. En: Honingberg BM, editor. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York, NY; 1990. pp. 213- 24.
- Stark JR, Judson G, Alderete JF, Mundodi V, Kucknoor AS, Giovannucci EL, *et al*. Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1406-11.
- Steffen C, Ankenbauer W, Poauer-Hofmann R, Bye S, Eeisen D, Frey B, *et al*. En: Steffens C, ed. *PCR applications manual 2 ed*. Mannheim: Roche; 1999. pp. 10-48.
- Steindel M, Dias Neto E, Meneses CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 60: 71-80.

- Stiles JK, Shah PH, Xue L, Meade JC, Lushbaugh WB, Cleary JD, *et al.* Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by HSP 70 Restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 441-5.
- Su HM, Tai JH. Genomic organization and sequence conservation in type I *Trichomonas vaginalis* viruses. *Virology* 1996; 222: 470-3.
- Swygard H, Seña AC, Hobbs MM, Cohen MS. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sex Transm Infect* 2004; 89: 91- 5.
- Tai H, Ip CF. The cDNA sequence of *Trichomonas vaginalis* virus T1 double stranded RNA. *Virology* 1995; 206: 773- 6.
- Tai JH, Su HM, Tsai J, Shaio MF, Wang CC. The divergence of *Trichomonas vaginalis* virus RNAs among various isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol* 1993; 76:278-286.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28: 2731-9.
- Tarr PI, Aline RF, Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9572-5.
- Taylor-Robinson D, Munday PE. Mycoplasmal infection of the female tract and its complications. En: Hare MJ (ed) *Genital tract infection in women*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1998; 228-47.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-82.
- Tuttle J, Holbrook T, Derrick F. Interference of human spermatozoal motility by *Trichomonas vaginalis*. *J Urol* 1977; 118: 1024– 5.

- Upcroft JA, Delgadillo-Correa MG, Dunne RL, Sturm AW, Johnson PJ, Upcroft P. Genotyping *Trichomonas vaginalis*. Int J Parasitol 2006; 36:821-8.
- Valadkhani Z, Sharma S, Harjai K, Gupta I, Malla N. *In vitro* comparative kinetics of adhesive and haemolytic potential of *T. vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic females. Indian J Pathol Microbiol 2003; 46:693-9.
- Valadkhani Z, Kazemi F, Hassan N, Aghighi Z, Esmaili I, Talebi M. Gene Diversity of *Trichomonas vaginalis* Isolates. Iranian J Parasitol 2011; 6:101-6
- van Belkum A, Homan W, Limper L, Quint WG. Genotyping isolates y clones of *Giardia duodenalis* by polymerase chain reaction: implications for the detection of genetic variation among protozoan parasite species. Mol Biochem Parasitol 1993; 61: 69-77.
- van Belkum A, van der Schee C, van der Meijden WI, Verbrugh HA, Sluiters HJ. A clinical study on the association of *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* infections in women attending a sexually transmitted disease (STD) outpatient clinic. FEMS Immunol Med Microbiol 2001; 32: 27-32.
- van der Scheen C, Sluiters JF, van der Meijden WI, van Beek P, Peerbooms P, Verbrugh HA, van Belkum A. Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urelyticum*. J Microbiol Methods 2001; 45: 61-7.
- Vanáčová S, Tachezy J, Kulda J, Flegr J. Characterization of trichomonad species and strain by fingerprinting. J Euk Microbiol 1997; 44: 545-52.
- Vancini RG, Benchimol M. Entry and intracellular localization of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. Arch Microbiol 2008; 189: 7-18.
- Vázquez F, Vázquez S, Palacio V. Actualización sobre *Trichomonas vaginalis* y Tricomoniasis. I. Enf Trans Sex 1993; 7: 363-75.
- Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M, *et al.* Evidence for *leishmania (viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. J Infect Dis 2006; 194:503-11.
- Vogel C, Chothia C. Protein family expansions and biological complexity. PLoS Comput Biol 2006; 2: e48.

- Vohra H, Sharma P, Sofi BA, Gupta I, Ganguly NK, Mahajan RC, Malla N. Correlation of zymodeme patterns, virulence & drug sensitivity of *Trichomonas vaginalis* isolates from women. Indian J Med Res 1991; 93: 37- 9.
- Wang AL, Wang CC. A linear double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. J Biol Chem 1985; 260: 3697-702.
- Wang AL, Wang CC. The double stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus like particles. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 7956- 60.
- Wang AL, Wang CC. Viruses protozoan. Annu Rev Microbiol 1991; 45: 251-63.
- Wang AL, Wang CC, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonad infected with double stranded RNA virus. J Exp Med 1987; 166: 142-50.
- Wang AL, Yang HM, Shen KA, Wang CC. *Giardiavirus* double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift. PNAS USA 1993; 90: 8595-9.
- Wang C, McClelland S, Reilly M, Overbaugh J, Emery SL, Mandaliya K, *et al.* The effect of treatment of vaginal infections on shedding of HIV-type I. J Infect Dis 2001; 183: 1017-22.
- Weber B, Mapeka TM, Maahlo MA, Hoosen AA. Double stranded RNA virus in South African *Trichomonas vaginalis* isolates. J Clin Pathol 2003; 56: 542-3.
- Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. Clin Dermatol 1996; 14:433-50.
- Welsh J, Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 7213-8.
- Wendel KA, Rompalo AM, Erbelding EJ, Chang TH, Alderete JF. Double stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* infecting patients attending a Sexually Transmitted Diseases Clinic. J Infect Dis 2002; 186: 558- 61.
- Whittington MJ. Epidemiology of infections with *Trichomonas vaginalis* in the light of improved diagnostic methods. Br J Vener Dis. 1957; 33: 80- 91.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 6531-5.

- World Health Organization, 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. WHO, Geneva.
- Xia W, Wolfe MS. Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases. *J Cell Sci* 2003; 116:2839-44.
- Xiao JC, Xie LF, Fang SL, Gao MY, Zhu Y, Song LY, *et al.* Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance in vitro. *Parasitol Res* 2006; 100: 123–30.
- Xiao JC, Xie LF, Zhao L, Fang SL, Lun ZR. The presence of *Mycoplasma hominis* in isolates of *Trichomonas vaginalis* impact significantly on DNA fingerprinting results. *Parasitol Res* 2008; 102:613-9.
- Yadav M, Dubey ML, Gupta I, Bhatti G, Malla N. Cysteine proteinase 30 in clinical isolates of *T. vaginalis* from symptomatic and asymptomatic infected women. *Exp Parasitol* 2007; 116:399-406.
- Yuan LJ, Gao XZ. Isoenzyme analysis on different isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2003;21: 102-5.
- Yuan LJ, Gao XZ. RAPD analysis on different isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2004; 22: 90-3.
- Zhang ZF, Begg CB. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Result of a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol* 1994; 23: 682-90.

***BIBLIOGRAFÍA DEL  
AUTOR***

## IX. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

### 9.1. Artículos donde se publican los resultados de este trabajo

1. **Fraga J**, Rojas L, Sariego I, Fernández-Calienes A. Double-stranded RNA viral infection in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. **Brazilian Journal of Infectious Disease 2005; 9(6): 521-524. Factor de impacto: 0.811**
2. **Fraga J**. Rojas L, Sariego I, Fernández Calienes A, Nuñez FA, Double-Stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* and association with clinical presentation. **Acta Protozoologica 2007; 46(2).93-98. Factor de impacto: 1**
3. **Fraga J**, Rojas L, Sariego I, Fernández-Calienes A. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* and correlation with genetic polymorphism of isolates. **Experimental Parasitology 2011; 127: 593-599. Factor de impacto: 1.869**
4. **Fraga J**, Rojas L, Sariego I, Fernández-Calienes A. Genetic characterization of three Cuban *Trichomonas vaginalis* virus. Phylogeny of *Totiviridae* family. **Infection Genetics and Evolution 2012; 12:113-120. Factor de impacto: 3.086**
5. **Fraga J**, Rodríguez N, Mondeja BA, Fernández C, Sariego I, Fernández-Calienes A, Rojas L. *Mycoplasma hominis* in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates: Association with parasite genetic polymorphism. **Experimental Parasitology 2012; 131: 393–398. Factor de impacto: 1.869**
6. **Fraga J**, Rojas L, Sariego I, Fernández-Calienes A. Species typing of Cuban *Trichomonas vaginalis* virus by RT-PCR, and association of TVV-2 with high parasite adhesion levels and high pathogenicity in patients. **Archive of Virology 2012; 157: 1789-1795. Factor de impacto: 2.209**

## 9.2. Artículos del autor relacionados con el tema

1. **Fraga J**, Rojas L, Sarriego I, Sarría CA. Optimization of RAPD techniques for use in genetic studies of *Trichomonas vaginalis* isolates. **Infection Genetic and Evolution** 2002; 2: 73-75.
2. Rojas L, Rodríguez M, Sarría CA, Palma S, Sarriego I, **Fraga J**. Frecuencia de la infección por *Trichomonas vaginalis* en parejas con trastornos de la fertilidad. **Revista Cubana de Medicina Tropical** 2002; 54(2): 85-90.
3. Comportamiento de la Trichomonosis vaginal en un grupo de adolescentes. Rojas L, Izquierdo A, Sarría C.A, Sarriego I, **Fraga J**. **Revista Cubana de Medicina Tropical** 2003; 55(4): 179-84.
4. **Fraga J**, Pelayo L, Sarriego I, Rojas L, Nuñez FA. La técnica de RAPD, obtención de marcadores genéticos de patogenicidad en *Trichomonas vaginalis* and *Giardia lamblia*. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología** 2004; 24 (Supl 1): 238-45.
5. Rojas L, **Fraga J**, Sarriego I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. **Infection Genetics and Evolution**. 2004.; 4(1): 53- 58.
6. Rojas L, Sarriego I, **Fraga J**, Sarría CA, Sarracent J, Sánchez L. Use of in vitro cytoadherence assays in the comparative study of the virulence of isolates of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research** 2004; 93 (4): 332- 337.
7. Rojas L, Sarriego I, Sarría CA, **Fraga J**. Comportamiento “in vivo” de aislamientos de *Trichomonas vaginalis*, utilizando ratones NMRI como modelo experimental. **Revista Chilena de Infectología** 2004; 21(3): 179- 85.
8. Sarriego I, Rojas L, **Fraga J**. Estudio de la susceptibilidad al metronidazol en aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*. **Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología** 2011; 37 (2): 271-276.

### **9.3. Eventos Científicos donde se han presentado los resultados de este trabajo**

- XI International Congress of Parasitology. Agosto 2006. Glasgow, Reino Unido.
- XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología, 20-26 de Octubre, Ciudad de Porlamar, Isla Margarita, Venezuela.
- VII Congreso Centroamericano de Parasitología y Medicina Tropical, 4-7 Diciembre del 2007, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.
- Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología y IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. 1-4 de Junio 2009. Palacio de las Convenciones, Cuba.
- Jornada Científica de la Universidad de Ciencias Informatica UCIENCIAS 2012. 20-22 febrero 2012. UCI, Cuba.
- Congreso QuimiCuba 2012. 9-12 Octubre 2012. Hotel Melia Habana, Cuba.

# ***ANEXOS***

**Anexo 1. Materiales y métodos comerciales utilizados en este trabajo.**

Producto	Abreviatura	Formula	Firma Comercial
<b>Reactivos de laboratorio</b>			
2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol	Tris-base	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$	Sigma, St Louis, Masachusset, EUA
5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido	X-gal	-	Promega, Madison, WI, EUA
Acetato de sodio	NaAc	$\text{CH}_3\text{COONa}$	Merck,Darmstadt, Alemania
Acido borico	-	$\text{H}_3\text{BO}_3$	Merck,Darmstadt, Alemania
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Merck,Darmstadt, Alemania
ADNasa I	-	-	Sigma, St Louis, Masachusset, EUA
Agarosa	-	-	Eurogentec, Amberes, Bélgica
Alcohol isolamilico	-	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$	Merck,Darmstadt, Alemania
Ampicillina	-	-	Vitrofarma, Bogota, Colombia
ARNasa H	-	-	Boehringer Mannheim, Alemania
Bacto agar	-	-	Difco and BBL Microbiology, Voigt, EUA
Bromuro de etidio	BrEt	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	Invitrogene, EUA
Citrato de sodio	-	$\text{Na}_2\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$	Sigma, St Louis, Masachusset, EUA
Cloroformo	-	$\text{CHCl}_3$	Merck,Darmstadt, Alemania
Cloruro de cesio	CsCl	CsCl	Merck,Darmstadt, Alemania
Cloruro de magnesio	$\text{MgCl}_2$	$\text{MgCl}_2$	Merck,Darmstadt, Alemania
Cloruro de potasio	KCl	KCl	Merck,Darmstadt, Alemania

Cloruro de sodio	NaCl	NaCl	Merck,Darmstadt, Alemania
Dodecilsulfato sódico	SDS	SDS	Merck,Darmstadt, Alemania
Estreptomina	-	-	Vitrofarma, Bogota, Colombia
Etanol absoluto	EtOH	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Merck,Darmstadt, Alemania
Extracto de levadura	-	-	Merck,Darmstadt, Alemania
Fenol	-	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Merck,Darmstadt, Alemania
Fosfato de potasio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma, St Louis, Masachusset, EUA
Fosfato de sodio dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma, St Louis, Masachusset, EUA
Gentamicina	-	-	Vitrofarma, Colombia
Isopropil-β-D-tio-galactósido	IPTG	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S <sub>1</sub>	Invitrogene, EUA
<i>NcoI</i>	<i>NcoI</i>	-	MBI, Fermentas, Alemania
Penicilina	-	-	Vitrofarma, Bogota, Colombia
Sacarosa	-	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sigma, St Louis, Masachusset, EUA
<i>SalI</i>	<i>SalI</i>	-	MBI, Fermentas, Alemania
Solución salina 0,9%	-	-	QIMEFA, Cuba
Peptona de Caseína tipo I	Triptona	-	Sigma, St Louis, Masachusset, EUA
<b>Métodos comerciales</b>			
ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing kit	-	-	PerkinElmer, EUA
Access RT-RCP System	-	-	Promega, Madison, WI, EUA
QIAamp® viral RNA mini kit	-	-	Qiagen, Hilden, Alemania
Qiagen one-step RT-RCP	-	-	Qiagen, Hilden, Alemania

Qiagen PCR Cloning Plus	-	-	Qiagen, Hilden, Alemania
QIAprep Spin Plasmid Kit	-	-	Qiagen, Hilden, Alemania
QIAprep® Spin Miniprep kit	-	-	Qiagen, Hilden, Alemania
QIAquick Gele Extraction Kit	-	-	Qiagen, Hilden, Alemania

**Anexo 2: Caracterización de 40 aislamientos de *T. vaginalis* según los hallazgos clínicos.**

<i>Código</i>	<i>Puntos</i>	<i>Clasificación Clínica</i>	<i>Presencia e intensidad de síntomas y signos</i>
<i>C91</i>	0	Asintomático	-
<i>C129</i>	0	Asintomático	-
<i>C175</i>	0	Asintomático	-
<i>C237</i>	0	Asintomático	-
<i>C239</i>	0	Asintomático	-
<i>C350</i>	0	Asintomático	-
<i>C353</i>	0	Asintomático	-
<i>C356</i>	0	Asintomático	-
<i>C358</i>	0	Asintomático	-
<i>C361</i>	0	Asintomático	-
<i>A59</i>	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
<i>A163</i>	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
<i>A170</i>	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
<i>A185</i>	6	Leve	Leucorrea blanca leve, disuria moderada
<i>C9</i>	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
<i>C12</i>	8	Leve	Leucorrea verde moderada, dispareunia leve.
<i>C15</i>	5	Leve	Leucorrea verde leve
<i>C98</i>	7	Leve	Leucorrea moderada amarilla, eritema cervical leve.
<i>C334</i>	6	Leve	Leucorrea verde moderada
<i>C344</i>	6	Leve	Leucorrea verde moderada
<i>A5</i>	13	Moderado	Leucorrea verde severa, eritema cervical moderado y vaginal moderado
<i>A42</i>	14	Moderado	Leucorrea amarilla severa, disuria severa, eritema cervical leve y vaginal leve
<i>A69</i>	16	Moderado	Leucorrea verde severa, dispareunia severa, eritema cervical leve y vaginal moderado
<i>C76</i>	10	Moderado	Leucorrea blanca leve, eritema cervical leve, vaginal moderado, vulvar leve
<i>C147</i>	10	Moderado	Leucorrea verde leve, prurito leve, eritema vaginal moderado
<i>C190</i>	10	Moderado	Leucorrea verde leve, dispareunia moderada, eritema vaginal leve
<i>C206</i>	12	Moderado	Leucorrea verde leve, disuria leve, dispareunia moderada, eritema vaginal leve
<i>C240</i>	14	Moderado	Leucorrea amarilla leve, disuria severa, dispareunia severa, eritema vaginal leve.
<i>C247</i>	12	Moderado	Leucorrea blanca severa, dispareunia moderada, eritema vaginal severo
<i>C187</i>	12	Moderado	Leucorrea blanca severa, dispareunia severa, eritema vaginal moderado.
<i>A47</i>	20	Severo	Leucorrea verde severa, prurito leve, disuria moderada, eritema cervical leve, vaginal severo y vulvar leve
<i>A66</i>	19	Severo	Leucorrea verde severa, prurito leve, disuria severa, eritema cervical leve y vaginal moderado
<i>C173</i>	20	Severo	Leucorrea blanca severa, disuria severa, dispareunia severa, eritema cervical leve, vaginal moderado y vulvar leve
<i>C308</i>	20	Severo	Leucorrea amarilla severa, prurito leve, disuria severa, dispareunia severa, eritema cervical leve y vaginal leve
<i>C313</i>	20	Severo	Leucorrea blanca leve, prurito leve, disuria severa, eritema cervical moderado, vaginal severo y vaginal severo
<i>C348</i>	22	Severo	Leucorrea verde severa, prurito leve, disuria severa, eritema cervical moderado, vaginal severo y vulvar leve.
<i>C349</i>	20	Severo	Leucorrea verde severa, dispareunia severa, eritema cervical leve, vaginal severo y vulvar moderado
<i>C351</i>	19	Severo	Leucorrea verde severa, disuria severa, dispareunia severa, eritema cervical leve y vaginal leve
<i>C352</i>	20	Severo	Leucorrea amarilla severa, prurito leve, disuria severa, eritema cervical severo y vaginal severo
<i>C355</i>	20	Severo	Leucorrea verde moderada, dispareunia severa, disuria severa, eritema cervical leve y vaginal severo

**Anexo 3. Secuencias de los cebadores utilizados para la secuenciación nucleotídica de los VTVs y el análisis del polimorfismo genético de los aislamientos de *T. vaginalis* mediante la técnica de RAPD.**

<b>Código</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>
Tv-1	12 mer	CGC ACT CGG AGT
Tv-2	12 mer	TCG GCC GCT ATC
Tv-3	12 mer	CCG TGA CAC GCA
Tv-4	12 mer	GGG ACA CTC TGG
Tv-5	12 mer	CCG CTG TAC TCC
Tv-6	12 mer	GGG ACC TAC TGC
Tv-7	12 mer	GAG TCG CAC AGG
Tv-8	12 mer	TCC TCA CCG ACC
Tv-9	12 mer	CCC CAG TAC CAG
Tv-10	12 mer	AGG GCG TCG GTA
OPA-1*	10 mer	CAG GCC CTT C
OPA-2*	10 mer	TGC CGA GCT G
OPA-3*	10 mer	AGT CAG CCA C
OPA-4*	10 mer	AAT CGG GCT G
OPA-5*	10 mer	AGG GGT CTT G
OPA-6	10 mer	GGT CCC TGA C
OPA-7	10 mer	GAA ACG GGT G
OPA-8	10 mer	GTG ACG TAG G
OPA-9	10 mer	GGG TAA CGC C
OPA-10	10 mer	GTG ATC GCA G
OPA-11	10 mer	CAA TCG CCG T
OPA-12	10 mer	TCG GCG ATA G
OPA-13	10 mer	CAG CAC CCA C
OPA-14	10 mer	TCT GTG CTG G
OPA-15	10 mer	TTC CGA ACC C
OPA-16	10 mer	AGC CAG CGA A
OPA-17	10 mer	GAC CGC TTG T
OPA-18	10 mer	AGG TGA CCG T
OPA-19	10 mer	CAA ACG TCG G
OPA-20	10 mer	GTT GCG ATC C

\*Cebadores utilizados para obtener los ADNc para la secuenciación de los genomas virales.

Tv: Cebadores diseñados al azar en nuestro grupo de trabajo (Fraga *et al.*, 2002)

OPA: Operon Technologie, California, EUA

Anexo 4. Número de acceso al Banco de Genes del genoma viral, tamaño del genoma completo, número de acceso a la proteína de la cápside (CP) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de los VTVs y otros miembros de la familia *Totiviridae* que se utilizaron en el análisis filogenético.

Género	Nombre del virus	Código <sup>a</sup>	Número de acceso Banco de genes genoma	Tamaño del genoma (nt)	Número de acceso Banco de genes CP	Número de acceso Banco de genes RdRp
<i>Giardiavirus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> virus	VTV1-1	U08999	4,647	NP_620729	AA62868
		VTV1-T5	U57898	4,648	ACC55468	AAC55469
		VTV1-IH2	DQ270032	4,647	ABC86750	ABC86751
		VTV1-Changhun	DQ528812	4,291	ABF577112	ABF57713
		VTV1-UR1	HQ607513	4,684	AED99811	AED99812
		VTV1-UH9	HQ607516	4,678	AED99813	AED99814
		VTV-OC3	HQ607517	4,648	AED99815	AED99816
		VTV1-OC4	HQ607521	4,680	AED99817	AED99818
		VTV1-OC5	HQ607523	4,680	AED99819	AED99820
		VTV2-1	AF127178	4,674	NP_624322	NP_624323
		VTV2-UR1	HQ607514	4,674	AED99805	AED99806
		VTV2-OC3	HQ607518	4,674	AED99807	AED99808
		VTV2-OC5	HQ607524	4,671	AED99809	AED99810
		VTV3-1	AF325840	4,844	NP_659389	NP_659390
		VTV3-UR1	HQ607515	4,845	AED99799	AED99800
		VTV3-OC3	HQ607519	4,846	AED99801	AED99802
		VTV3-OC5	HQ607525	4,842	AED99803	AED99804
		VTV4-1	HQ607522	4,943	AED99795	AED99796
		VTV4-OC3	HQ607520	4,944	AED99793	AED99794
		VTV4-OC5	HQ607526	4,942	AED99797	AED99798
<i>Giardia lamblia</i> virus	<i>Giardia lamblia</i> virus	GLV1	L13218	6,277	AAB01578	AAB01579
		GLV2	AF525216	6,237	AAM77693	AAM77694
		GCV	DQ238861	6,276	ABB36742	ABB36743
<i>Leishmaniavirus</i>	<i>Leishmania</i> virus	LRV1-1	M92355	5,284	AAB50023	ABB50024
		LRV2-1	U32108	5,241	AAB50030	AAB50031
		LRV1-4	U01899	5,283	AAB50027	AAB50028
<i>Totivirus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus	ScVL-A	J04692	4,579	AAA50506	AAA50508
		ScVL-BC	U01060	4,615	AAB02145	AAB02146

	<i>Eimeria brunette</i> virus	EbV1	AF356189	5,358	AAK26437	AAK26438
<i>Victorivirus</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i> totivirus	BfTV1	NC_009224	5,261	YP_001109579	YP_001109580
	<i>Chalara elegans</i> ARN Virus 1	CeRV1	AY561500	5,310	AA568035	AA568036
	<i>Coniothyrium minitans</i> mycovirus	CmRV	AF527633	4,975	AA014998	AA014999
	<i>Epichloe festucae</i> virus 1	EfV1	AM261427	5,109	CAK02787	CAK02788
	<i>Gremmeniella abietina</i> virus	GaRV-L1	AF337175	5,133	AAK11655	AAK11656
		GaRV-L2	AY615210	5,129	AAT48884	AAT48885
	<i>Helicobasidium mompa</i> totivirus 1-17	HmTV1-17	AB085814	5,207	BAC81753	BAC81754
	<i>Helminthosporium victoriae</i> virus 190S	HvV190S	HVU41345	5,179	AAB94790	AAB74791
	<i>Magnaporthe oryzae</i> virus	MoV1	AB176964	5,359	BAD60832	BAD60833
		MoV2	AB300379	5,193	BAF98177	BAF98178
	<i>Sphaeropsis sapinea</i> virus	SsRV1	AF038665	5,163	AAD11600	AAD11601
		SsRV2	AF039080	5,202	AAD11602	AAD11603

<sup>a</sup> Abreviatura del nombre de los virus incluyendo la designación de los aislamientos.

**Anexo 5. Conservación de la proteína de la cápside entre los VTVs. Las secuencias CP están alineadas. Las regiones conservadas para las 4 especies de VTVs están sombreadas en gris y las que solo se conservan para las especies VTV-2, 3 y 4 en negro.**

NP_620729_CP_TV1-1	-----	-----MEAS	-----ANGL	SHDDNANKSQ	NVGPST----	---LPRSDKQ	GGEKHNSFN	-----	[ 80]
AAC55468_CP_TV1-T5	-----	.....	.....	...K..N..	.....	---.G....	.....	-----	[ 80]
ABC86750_CP_TV1-IH2	-----	.....	.....	..R..	.....	.....	.....I...	-----	[ 80]
ABF57712_CP_TV1-Changchun	-----	.....	.....	.....I..H	.....	---.G....	.R...I....	-----	[ 80]
AED99815_CP_TV1-OC3	-----	.....	.....	.....TR..	.....	---.G....	.....	-----	[ 80]
AED99813_CP_TV1-UH9	-----	.....	.....	..E..TR..	.....	---.G....	.....	-----	[ 80]
AED99817CP_TV1-OC4	-----	.....	.....	..E..TR..	.....	---.G....	.....	-----	[ 80]
AED99811_CP_TV1-UR1	-----	.....	.....	.....	.....	---.G....	...N.....	-----	[ 80]
AED99819_CP_TV1-OC5	-----	.....	.....	.....	.....	---.G....	...N.....	-----	[ 80]
TV1-C344	-----	.....	.....	...V..	...V....	.....	.....	-----	[ 80]
NP_624322_CP_TV2-1	-----	-MASTLISSD	-----NSAT.	GK.SEVINNT	.TS.PD----	-NPSSDHSNP	RLT.VLDEMS	-----	[ 80]
AED99809_CP_TV2-OC5	-----	-MASTLISSD	-----NSAT.	GK.SEVINNT	DTS.PD----	-NPPSDHSNP	QLT.ILDEMS	-----	[ 80]
AED99805_CP_TV2-UR1	-----	-MASTLISSD	-----NSAT.	GKVNEVINNT	DTS.PD----	-TSPGDHSNP	RLT.ILDEMS	-----	[ 80]
AED99807_CP_TV2-OC3	-----	-MASTLISSD	-----NSATS	GTVGEVINNT	DTS.PD----	-TPPSDHSNP	RLT.ILDEMS	-----	[ 80]
TV2-C76	-----	-MASTLISSD	-----ISAT.	RIYSEVINNT	.TS.PD----	-NPMSDHSNP	RLT.VLDELS	-----	[ 80]
TV2-C351	-----	-MASTLISSD	-----KSAT.	GK.TEVINMP	.SS.PD----	-NPSWDHSFP	.LTMVLDDMS	-----	[ 80]
NP_659389_CP_TV3-1	MSAPEP----	--LNTEVRSP	-----NGVSE	AJETQNMVAV	QSSV.N----	--EIKNDTQS	DLQTLKKQLQ	-----	[ 80]
AED99803_CP_TV3-OC5	MSAPEP----	--LNTEVRSP	-----DGVSE	ATETQNLAIT	QSRV.N----	--EKITDTQS	DLQTLKKQSQ	-----	[ 80]
AED99801_CP_TV3-OC3	MSAPEP----	--LNTEVRSP	-----NGVSE	ATETQNLAVT	QSSV.N----	--EKITDTQS	DLQTLKKQLQ	-----	[ 80]
AED99799_CP_TV3-UR1	MSAPEP----	--LNTEVRSP	-----NGVSE	AKETQNLAIT	QS.V.N----	--EKITDTQS	DLQTLKKQLQ	-----	[ 80]
AED99797_CP_TV4-OC5	MSAIATIAS	ANLNDLRSRA	NAPQNEGVP	LAPQON.AKP	.T..PDPGEG	TKQQTNSL	SANDFTKEHT	PATTIQKDTT	[ 80]
AED99795_CP_TV4-1	MSAITATISS	ANLNDLRSRA	NAQQNNGVP	LAPQONIAKP	.T..PDPGDG	TRQQTIPSSP	KTDD.TKEPV	SAPTTQQNVT	[ 80]
AED99793_CP_TV4-OC3	MSAIAATISS	ANLNDLRSRA	GAQPKEGVP	PVLQQNIATP	KT..PDPGEG	TRKQTTDSPH	SANPSTKEHT	PAPTIQPDTP	[ 80]
NP_620729_CP_TV1-1	-----	---SFSNDF	FNFLRMSTNT	HISDSPGVSF	VAKDGTPIYSS	LTIPSGVGR	THNVVASAVQ	LNITASNTLE	[160]
AAC55468_CP_TV1-T5	-----	.....	.....M..	.....	IG...A...	V..Q.A...	.....	..V..D.V..	[160]
ABC86750_CP_TV1-IH2	-----	.....	.....	.....	.G.....	A...A.S..	.....A.A.	...SD.V..	[160]
ABF57712_CP_TV1-Changchun	-----	.....	.....	.....	IG.....	A...A...	..E.I....	...ST....	[160]
AED99815_CP_TV1-OC3	-----	---Y..	.....AH.	.....	.G.....T	A..Q.A...	...I....	..V..D.V..	[160]
AED99813_CP_TV1-UH9	-----	.....	.....I.AQ.	.....	IG.....	T...A...	.....	..V..D.V..	[160]
AED99817CP_TV1-OC4	-----	.....	.....AQ.	...N....	IG.....	A...A...	.....	..V..D.V..	[160]
AED99811_CP_TV1-UR1	-----	.....	.....T..S.	.....	.S.....T.	A..Q.A...	.....	...N....	[160]
AED99819_CP_TV1-OC5	-----	.....	.....T..S.	.....	.L.....T.	A..Q.A...	.....	...N....	[160]
TV1-C344	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...G....	[160]
NP_624322_CP_TV2-1	-----	KKPCVNINEI	RKMI.NFQPP	F.QPRN.NRP	N.QPR.VD.F	EWVVR--IQS	.VETQLLGAT	NTVPQQ--.N	[160]
AED99809_CP_TV2-OC5	-----	KKPCVNINEI	RKMI.NFQPP	F.QLRN.NRP	N.QPR.VD.F	EWVVR--IQS	.VETQLLGAT	NTVPQQ--.N	[160]
AED99805_CP_TV2-UR1	-----	KKPCVNINEI	RKMI.NFQPP	I.QPRN.NRP	ANQPR.VD.F	EWVVR--IQS	.V.TQLLGAT	NT.PEQ--.N	[160]
AED99807_CP_TV2-OC3	-----	KKPCVNINEI	RKVI.NFQPP	I.QPRN.NRP	G.QPR.VN.F	EWVVR--IQS	.V.TQLLGAT	NT.PEQ--.N	[160]
TV2-C76	-----	KLPCRNINEI	RKMI.NFQPH	F.QRRY.YRR	NPLPRREDNF	.WVVRNRIQS	SVETQFL.AT	NSVPQQ--S.N	[160]
TV2-C351	-----	KNPFVNINEI	RSVI.NFQRQ	M.LPRT.IRP	D.QPR.VD.F	EGVVR--RIQ	.VETQLVGAT	YTVLQE--.QN	[160]
NP_659389_CP_TV3-1	-----	--PLYRSTD.	ETLYNYFYGL	DVPA.TDRVG	H.IQRNTSVN	D.NEVVSFP.	.AT.SHTFSN	TPVP.N-IQP	[160]
AED99803_CP_TV3-OC5	-----	--PVSRTSD.	ETLYNYFYGL	DV.P.TDRIG	N.ITRNTPVT	D.NEVVSFP.	.AS.SHTFSN	SPVP.H-IQP	[160]
AED99801_CP_TV3-OC3	-----	--PVSRTSD.	ETLYNYFYAL	NV.P.TDRIG	N.ITRNTPVN	D.NEVVSFP.	.AS.SHTFSN	TPVP.H-IQP	[160]
AED99799_CP_TV3-UR1	-----	--PVSRTSD.	ETLYNYFYGL	QVPA.TDRIG	N.IQRNIPVN	D.NEVVSFP.	.AS.SHTFSN	TPVP.H-IQP	[160]
AED99797_CP_TV4-OC5	IPNTDLPSSSE	EGPRTHSTD.	QTLYEYFYSY	PVPA.QTRTG	G.ITRNGPVN	DNNEVVSFTT	ETAL.T.LTP	RH.DTN-IQP	[160]
AED99795_CP_TV4-1	TSDKELPDSA	EGPRTHSTD.	QTLYEYFYSY	PVPA.QTRTG	G.IARNGPVN	DNNEVVSFTT	ETAL.T.LTP	RH.D.N-IQP	[160]
AED99793_CP_TV4-OC3	TPITDHSDE	EGPRTHSTD.	QTLYEYFYSY	PVPA.QTRTG	G.IARAGPVN	DNNEVVSFTT	ETAL.T.LTP	KH.D.N-IQP	[160]

NP_620729_CP_TVV1-1	VDYGFQDVS	RTTG---TIP	IPIFDGEKYK	ETARALAAIF	SKKGMSVDVT	SQTVQETLKN	SDLTIATVAA	GYTALAARH	[240]
AAC55468_CP_TVV1-T5	.....	.A.---..	.....	.....M..	.....	.....	.....	.....	[240]
ABC86750_CP_TVV1-IH2	.....	.S.---.T	.....	.....	.....SA.....	.....	.....	.....	[240]
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	.....	.....	.....	.....	N.....	.....E.....	.....	.....	[240]
AED99815_CP_TVV1-OC3	.....	.SA.---.T	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....	[240]
AED99813_CP_TVV1-UH9	.....	.S.---.T	.....	.....T..	.....A.....	.....	.....	.....	[240]
AED99817CP_TVV1-OC4	.....	.S.---.T	.....	.....	N.....A.....	.....	.....	.....	[240]
AED99811_CP_TVV1-UR1	.....	.A.---.T	.....	.....V....SLV.	.....AL...	.....D..M.	.....	.....	[240]
AED99819_CP_TVV1-OC5	.....	.A.---.T	.V.....	.V....SL..	.....TAI.T.	...I.D....	.....	.....	[240]
TVV1-C344	.....	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....L	[240]
NP_624322_CP_TVV2-1	L.IS.TD.ST	TI.PASIPGS	.SML.NSRHI	PAIQSMIQN.	KARYLGLSQD	TAQL.SPQYP	Q---LLAYLF	.QLI.IKD.L	[240]
AED99809_CP_TVV2-OC5	L.IS.TD.ST	TI.PASIPGS	.SML.NSRHI	PAIQSMIQN.	KARYLGLSQD	AAQLNSPQYP	Q---LLAYLF	.QLI.IKD.L	[240]
AED99805_CP_TVV2-UR1	L.IS.TD.ST	TI.PASIPGS	.SML.NSRHI	PAIQSMIQN.	KARYLGNLQD	TAQLNSPQYP	Q---LLAYLF	.QLI.IKD.L	[240]
AED99807_CP_TVV2-OC3	L.IS.TD.ST	TI.PASIPGS	.SML.NSRHI	PAIQSMIQN.	KARYLGNLQD	TAQLNSPQYP	Q---LLAYLF	.QLI.IKD.L	[240]
TVV2-C76	L.ISLTDST	SI.PGSILGS	.KMLENSHHF	PAFKSMIQ..	NARYGGSFQD	.AHL.SPQYP	Q---LLAYLF	.QLI.IKD.V	[240]
TVV2-C351	H.KS.TE.ST	TI.PASIPGS	.SLL.KSRHN	RSILRIQON.	KANYLGYLLD	TPQL.TPQYP	Q---LLAYLF	.QLI.IWD.L	[240]
NP_659389_CP_TVV3-1	LQISVAD.SV	NYELDESGTL	C.TL.SSVHV	QR.TS..SAL	KV.LTGEIMH	.DS.RPVQTP	Q---LIAYLF	.VLLGVKD.V	[240]
AED99803_CP_TVV3-OC5	LQISIAD.CI	NYELDESGTL	C.AL.SSVHV	QR.TS..SAL	KV.LTGEIMH	.SS.RPIQTP	Q---LIAYLY	.VLL.VKD.I	[240]
AED99801_CP_TVV3-OC3	LQISIAD.CV	NYELDESGTL	C.AL.SSVHV	QR.TS..SAL	KV.LTGEVMH	.AS.RPIQTP	Q---LIAYLY	.VLL.VQD.L	[240]
AED99799_CP_TVV3-UR1	LQISVAD.C?	NYELDESGTL	C.AL.SSVHV	QR.TS..SAL	KV.LTGEVMH	.AS.RPIQTP	Q---LIAYLY	.VLL.VQD.I	[240]
AED99797_CP_TVV4-OC5	LQISIAD.CV	NYSQYSGQT	C.....SQHV	QS.T...SSM	KARL.CEVTQ	.LSARPVQQP	Q---.IAYLY	.ALL..GD.L	[240]
AED99795_CP_TVV4-1	LQISIAD.CV	NYSCEYSGQT	C.V...SQHV	QS.T...SSM	KARL.CEVTQ	.LSARPVQQP	Q---VIAYLY	.ALL.FGD.L	[240]
AED99793_CP_TVV4-OC3	LQISIAD.CV	NYSQYSGQT	C.....SQHV	QS.T...SSM	KARL.CEVTQ	.LSARPVQQP	Q---LIAYLY	.ALL.FGD.L	[240]
NP_620729_CP_TVV1-1	ELTK-DVSEA	AHTIPFVTAL	SDTFSAAALNA	QRTSHVISSC	LRCPNRQAQ	RDIVIGTVLW	NNVFVESLSE	HNMAVNPND	[320]
AAC55468_CP_TVV1-T5	....-A.V.	.....A...	....T.P..	..S.....	....A.G.I.	H..G..STI.	T..I.....P	Q.....D.	[320]
ABC86750_CP_TVV1-IH2	....-E.L.	Q.....	....T.RG.	..S.....	....A.N...	..VA..NM.	T...I...A	Q..V...A..	[320]
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	....-Q.V.	T....Y....	....T.Q..	..S..I....	....AH.V.	...G...M.	T..S...AA	P..V.....	[320]
AED99815_CP_TVV1-OC3	....-E.M.	.....	....PD.	..S.....	....H.N.I.	H..G...DI.	...S.....P	Q.....	[320]
AED99813_CP_TVV1-UH9	....-Q.V.	S.....	....L...QG.	..S.....	....H.N.V.	H..VG...DM.	...S.....P	Q.....	[320]
AED99817CP_TVV1-OC4	....-Q.V.	..S.....I	....LA..QD.	..S.....	....HCN...	H..G...NM.	...S.....P	Q.....	[320]
AED99811_CP_TVV1-UR1	....-EA.V.	..R.....	....T.D..	..S.....	....A.N...	.QVTV..NM.	T..S..N.AV	QGA.I.....	[320]
AED99819_CP_TVV1-OC5	....-AE.T.	..R...A...	....GD.	L.S.....	....A.N...	.QVTV..NM.	T..S..NIAV	QGLII.....	[320]
TVV1-C344	.....	.....	....RD.	.....	.....	.....	.....	.....	[320]
NP_624322_CP_TVV2-1	D.FRPSNPLS	LADAL.GFT.	AQNARPRYDD	H.HAKACQGP	.VI.AAT.SD	CGPCGFVQIN	A.QGLT-.PL	GACLFV..ET	[320]
AED99809_CP_TVV2-OC5	D.F.PSNPLS	LADAI.GFT.	AQHAHPRYDD	H.HAKACTGP	.VI.AAT.SD	CGPCGFVQIN	A.QALT-.PL	GACLFV..ET	[320]
AED99805_CP_TVV2-UR1	D.FRPSNPLS	FADAL.GFT.	AQHAHPRYDD	H.HAKACTGP	IVI.AAT..D	CGPCGFVQIN	A.QGLT-.PL	GACLFV..ET	[320]
AED99807_CP_TVV2-OC3	D.FRPSNPLS	FADAL.GFT.	AQNARPRYDD	HIHAKACTGP	IVI.AAT..D	CGPCGFVQIN	A.QGLT-.PL	GACLFV..DT	[320]
TVV2-C76	D.FRPSNPLS	LADAL.GFT.	AQNARPRYDD	HSYAKACQEP	.VI.AAS.SD	CGACGFGQIN	A.QPLT-.PL	GAWFFV..ET	[320]
TVV2-C351	D.LRPSNPLS	LADALNGFT.	AQYARPRYDD	H.HAWACQGP	.VI.AAS.SD	CGPCGFVQIN	A.QGQT-.PL	GACHFV..ER	[320]
NP_659389_CP_TVV3-1	NIHR-NQPTN	LWRSLCSPGR	AAQAKPFFDE	FPNNKFRPGA	.LA.PLPD.G	FGPFFPAEG.N	Q.SKLD-FRS	KGYVIFYKQRT	[320]
AED99803_CP_TVV3-OC5	NIHR-NQPTN	LWRSLCAAGR	AAQAKPFFDE	IPNNKFRPGA	.VA.PLPE.G	FGPFFPAEG.N	Q.SKLD-FKA	KAYVIFYKQRT	[320]
AED99801_CP_TVV3-OC3	NIHR-NQHTN	LWRSLCAAGR	AAQAKPFFDE	IPNNKFRPGA	.LA.PLPD.G	FGPFFPAEG.N	Q.SKLD-FKS	KGYVIFYKQRT	[320]
AED99799_CP_TVV3-UR1	NIHR-NQPTN	LWRSLCAPGR	AAQAKPFFDE	FANNKFRAGP	.LA.PLPD.G	FGPFFPAEG.N	Q.SKLD-FKS	KGYVIFYKQRT	[320]
AED99797_CP_TVV4-OC5	NIHY-GNKVN	LWNALLGHN.	QRGAPINGEN	FNHLL.DGP	.AP.ILPA.G	LGFFPS.T.G	P.TT.T-FKA	RASIFVR.QT	[320]
AED99795_CP_TVV4-1	N.HY-GNKVN	LWNALLGHN.	QRATPVNGD.	FNHLL.DGA	.AP.ILPA.G	LGFFPS.T.G	P.TT.T-FKA	RASIFVR.QT	[320]
AED99793_CP_TVV4-OC3	NIHY-GNKVN	LWNALLGHN.	QRGTPINGDN	FNHLL.DGP	.AP.ILPA.G	LGFFPS.T.G	P.TT.T-FKA	RASIFVR.QT	[320]

NP_620729_CP_TVV1-1	ISFFIPNKAL	SSSWWCAIWL	LNAFLHSFIA	PTRIHIFITQ	G--ETYHLAP	FTDSDVYEAV	RFLLAMSKSS	RMPESVESM	[400]
AAC55468_CP_TVV1-T5	.....P	.....P	.....V	.....V	---.....	.....	.....	.....	[400]
ABC86750_CP_TVV1-IH2	V.....S	PP.....	.....V	.....F	.....P	---.....	.....A	.....I	[400]
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	.....S	P.....	.....Q	.....H	.....P	---.....	.....T	.....L	[400]
AED99815_CP_TVV1-OC3	V.....P	.....P	.....I	.....V	.....F	.....AP	---.....	.....A	[400]
AED99813_CP_TVV1-UH9	V.....P	PPP.....	.....I	.....V	.....F	.....AP	---.....	.....A	[400]
AED99817CP_TVV1-OC4	.....P	PPP.....	.....I	.....V	.....H	.....P	---.....	.....A	[400]
AED99811_CP_TVV1-UR1	V.....P	.....P	.....V	.....Q	.....F	.....P	---.....	.....N	[400]
AED99819_CP_TVV1-OC5	V.....S	PP.....	.....Q	.....P	---.....	.....N	.....A	.....I	[400]
TVV1-C344	.....R	.....N	.....T	.....RL	.....	.....P	---.....	.....P	[400]
NP_624322_CP_TVV2-1	VNDQSFQDF	WLIFATHHRM	P.QMQNNWPF	SLN.VSTCAA	PGRQAP.AGE	L..ER.RL.L	DTGHRILL.M	FNDD.ETLRY	[400]
AED99809_CP_TVV2-OC5	VNDQSFQDF	WLVFATHHRM	P.QMQNNWPF	ALN.VSTCAA	PGRQAP.AGE	L..ER.RL.L	DTGHRILLAM	FNDD.ETLRY	[400]
AED99805_CP_TVV2-UR1	VNDQSFQDF	WLIFATHHRM	P.QMQNDWPF	ALN.VSTCAA	PGRQAPQAGQ	.EAR.KL.L	DTGHRILL.M	FNDD.EALRY	[400]
AED99807_CP_TVV2-OC3	VNDQSFQDF	WLIFATHHRM	P.QMQNNWPF	ALN.VSTCAA	PGRQVPQAGQ	L..ARFHA.L	DTGHRILL.M	FNDD.ETLRY	[400]
TVV2-C76	VNYQSFQDF	WL.FATHQRM	P.QMQNNWPF	SLN.VSTCAA	PGRQAP.AGE	L..ER.RL.L	DTGHRILL.M	FNDD.ETLRY	[400]
TVV2-C351	VNDQSFQEF	WLIFATHHRM	P.QMQNNWPF	SLN.VSTCAA	PDRQAP.AGE	L.EER.RL.R	DTGHRILL.K	KNDD.ETLRY	[400]
NP_659389_CP_TVV3-1	YNPDEM.R.F	WFL.AIYNRM	PED.QL.YPL	NITFCTSELP	VQNPMPGADA	ISNEQCEK.L	LL.EKVVLEF	FNDRKLAYY	[400]
AED99803_CP_TVV3-OC5	YNPDDM.R.F	WFI.AIYNRM	P.D.QN.YPL	NITFCTSELP	VQSPMPTADG	ISAEQCDK.L	LL.DKIVLEF	FNDRKLAYY	[400]
AED99801_CP_TVV3-OC3	YNPDDM.R.F	WFI.AIYNRM	PED.QN.YPL	NITFCTSELP	VQSPMPAADG	ISAEQCDR.L	VL.DKVILEF	FNDRKLAYY	[400]
AED99799_CP_TVV3-UR1	YNPDDM.R.F	WFL.AIYNRM	PGE.QQYYQL	NITFCTSELP	VQNPPIPADG	ISNEQCEK.L	LL.EKIILEL	FNDRKLAYY	[400]
AED99797_CP_TVV4-OC5	YDYALVDA.F	WLIYAMYSRM	PV..RQ.YSL	NIDFFTQVPM	AACVFPBGHDG	..TPVIDQ.L	GV.ES.LVEM	FNGDREIMYY	[400]
AED99795_CP_TVV4-1	YDYALVDA.F	WLIYAMYSRM	PV..RQAYS	NVDFFTQVPM	AACVFPBGHDG	..TPVIDQ.L	GV.ES.LVEM	FNGDRQIMYY	[400]
AED99793_CP_TVV4-OC3	YDYALVDA.F	WLIYAMYSRM	PV..RQAHS	NIDFFTQVPM	AACVFPBGHDG	..TPVIDQ.L	GV.ES.LVEM	FNGDREIMYY	[400]
NP_620729_CP_TVV1-1	LYAYGTQMII	QPHSLYTEGG	LIRRMIFTVP	HLPAGYFVT	NSEFSRYMN-	IAVPDDPRSA	KDFVIGAGTG	LLQIVLAYQA	[480]
AAC55468_CP_TVV1-T5	.....S	.....	.....	.....	.....-	.....	.....V	.....	[480]
ABC86750_CP_TVV1-IH2	.....	.....	.....K	.....	.....-	.....N	.....YI	.....	[480]
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	.....	.....	.....K	.....	.....-	.....N	.....V	.....	[480]
AED99815_CP_TVV1-OC3	.....	.....	.....K	.....	.....Y	.....N	.....I	.....T	[480]
AED99813_CP_TVV1-UH9	.....	.....	.....	.....	.....Y	.....N	.....I	.....T	[480]
AED99817CP_TVV1-OC4	.....	.....	.....K	.....	.....Y	.....N	.....I	.....I	[480]
AED99811_CP_TVV1-UR1	.....V	.....	.....I	.....K	.....	.....A	.....Y	.....N	[480]
AED99819_CP_TVV1-OC5	.....A	.....V	.....IV	.....	.....IA	.....T	.....Y	.....N	[480]
TVV1-C344	.....	.....	.....I	.....	.....	.....	.....G	.....	[480]
NP_624322_CP_TVV2-1	YQRK.IETMF	R.CCF.....	L.KATRY.S	MV.LN.LYYY	.GAT.YVVSP	.HTDAH.G--	----.T.AIE	SFVDIMVL..	[480]
AED99809_CP_TVV2-OC5	YQRK.IETMF	R.CCF.....	L.KATRY.S	MV.LN.LYYY	.GAT.YIVSP	.HTDAH.G--	----.T.AIE	SFVDIMVL..	[480]
AED99805_CP_TVV2-UR1	YQRK.IETMF	R.CCF.....	L.KATRY.S	MV.LS.LYYY	.GAS.YVVSP	.HTDAH.G--	----.T.AVE	SFVDIMVL..	[480]
AED99807_CP_TVV2-OC3	YQRK.IETMF	R.CCF.....	L.KATRY.S	MV.LS.LYYY	.GAS.YIVTP	.HTDAH.G--	----.T.AIE	SFVDIMVL..	[480]
TVV2-C76	YQRK.FETMF	R.CWF.....	L.KATRY.S	GV.LN.LYYG	DGAT.YVVSP	.HTDAH.G--	----.T.AIE	SFVDIMVL..	[480]
TVV2-C351	YQLK.IETMF	R.CC.....	L.KATRY.S	MV.LN.LYYY	.GAT.YVVSS	.VTDAH.G--	----.TSAIE	SFVDIMVL..	[480]
NP_659389_CP_TVV3-1	YVFK.C.FVM	R.C.C.Q...	..KASRN.A	LRGFT.IYYL	AGFTDQ.A.M	.SCAVH.G--	----.VVGALF	QYVDTMVL..	[480]
AED99803_CP_TVV3-OC5	YVFK.S.FVM	R.C.C.Q...	..KASRN.A	LRAFT.IYYL	AGFAEQ.A.M	.SCASH.G--	----.IGALF	QYVDTMVL..	[480]
AED99801_CP_TVV3-OC3	YVFK.C.FVM	R.C.C.Q...	..KASRN.A	LRAFT.IYYL	AGFAEQ.A.M	.SCATH.G--	----.IGALF	QYVDTMVL..	[480]
AED99799_CP_TVV3-UR1	YIFK.S.FVM	R.C.C.Q...	..KASRN.A	LRAFT.IYYL	AGFADQ.A.M	.SCAAH.G--	----.VIGALF	QYVDTMVL..	[480]
AED99797_CP_TVV4-OC5	YAFK.G.VFM	R.C.C.Q...	..KASRN.S	LASFT.IYSL	IGYCAPEARP	LHAANH.G--	----.I.ALF	QYVDTMVL..	[480]
AED99795_CP_TVV4-1	YAFK.G.LFM	R.C.C.Q...	..KASRN.S	LASFT.IYSL	IGYCAPDARP	LHAASH.G--	----.I.ALF	QYVDTMVL..	[480]
AED99793_CP_TVV4-OC3	YAFK.G.IFM	R.C.C.Q...	..KASRN.S	LASFT.IYSL	IGYCAPEARP	LHAANH.G--	----.I.ALF	QYVDTMVL..	[480]

NP_620729_CP_TVV1-1	AFSCAG	IAL	HWHANDAISQ	GMDRVASIYL	EGRYFTIPMA	VNVATNVAQY	TTMVRADPEY	RHTLDRILPR	IFGPSTDTVF	[560]
AAC55468_CP_TVV1-T5	.....	.....	.....	...T...T...	Q.....	.....R.	..T.....Q.	KR.....	.....I.	[560]
ABC86750_CP_TVV1-IH2	.L.....	.....G.....	.....	...TI.TT..	Q.....V.I.	A..VN.....	..L.....	....E.....	.....I..IY	[560]
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	.L.....	.....G..IT.E	.....	...I.DT..	.....	A.....	..IR.....	.....	.....	[560]
AED99815_CP_TVV1-OC3	.....	.....	.....	...TI.ET..	Q.....V...	.A.....	..L....Q.	.....	.....	[560]
AED99813_CP_TVV1-UH9	.....	.....	.....	...D.....	...TI..T..	.....I.	..A.....	.....Q.	.....	[560]
AED99817CP_TVV1-OC4	.....	.....	.....	...TI.GT..	.....	.A.....	..LI.T.Q.	....E.....	.....Y	[560]
AED99811_CP_TVV1-UR1	....G.....	.....H	.....	...T..AA..	.....	I.....I...	..G....Q.	K.S.....	.....	[560]
AED99819_CP_TVV1-OC5	.....	.....D.....N	.....	...T..AA..	.....	.....I...	..R....Q.	K.....	.....	[560]
TVV1-C344	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....	.....	.....	[560]
NP_624322_CP_TVV2-1	V..FS..KVV	AAKV.ASQID	AAMVFGPAVA	..DG.VYDPL	RPAPPLS.F.	.EFIH-R.AE	QRIFQMAMSQ	.Y.SHAPLII	[560]	
AED99809_CP_TVV2-OC5	V..FT..KVV	AAKV.ANQLD	PAMIFGPAIA	D.DG.VYDPL	RPAPPLS.F.	SEFIH-R.AE	QRIFQMAMSQ	.Y.SHAPL.I	[560]	
AED99805_CP_TVV2-UR1	V..FS..KVV	AAKVDANQID	ASSVFGPAVA	..DG.VYDPR	RPAPPLS.F.	.EFIH-R.AE	QRIFQMAMSQ	.Y.SHAPLII	[560]	
AED99807_CP_TVV2-OC3	V..FT..KVV	AAR.DANQVD	ASSVFGPAVA	..DG.VYDPR	RPAPPLS.F.	SEFIH-R.AE	QRIFQMAMSQ	.Y.SHAPLII	[560]	
TVV2-C76	V..FS..KVV	GAKV.AGQID	AAMVGGPAVA	..DG.VYDPL	RPAPPLS.FF	.EFIH-R.AG	QRIFQMAMSQ	.YPSHAPLGI	[560]	
TVV2-C351	V..FS..KVV	AAKV.ARKID	AAMVFGPAVA	.VDG.VYDPL	LPAPPLS.F.	.EFIH-R.AE	LRIFQ.AMSQ	.Y.SHAPLII	[560]	
NP_659389_CP_TVV3-1	V..LS..KLV	RFA.PPEYQG	RHACPF.FVA	DEN.WG.APG	IEAEPVGMV	MDIIQ-RKAE	HDLFIETFMD	.Y.STASIIC	[560]	
AED99803_CP_TVV3-OC5	V..LS..KLV	RFA.PPEYQG	RHACPF.FVA	DEN.WG.APG	S.AEPPVGMV	.EIIQ-RKTE	HNLFTETFMD	.Y.STASVIC	[560]	
AED99801_CP_TVV3-OC3	V..LS..KLV	RFA.PPEYQG	RHACPF.FVA	DEN.WG.APG	SDAEPVGMV	MDIIQ-RKAE	HDLFTETFMD	.Y.STASIIC	[560]	
AED99799_CP_TVV3-UR1	V..LS..KLV	RFA.PPEYQG	RHACPF.FVA	DEN.WG.APG	S.AEPPVGMV	MDIIQ-RKSE	HNLFVDTFMD	.Y.STASIIC	[560]	
AED99797_CP_TVV4-OC5	VL.YS..KLI	.FG.APEFAT	KGSTPYNFID	PDN.WG.RAG	..AHPVGY	LDILM-RQKE	HQL..ET.SD	.Y.HVGSGLAM	[560]	
AED99795_CP_TVV4-1	VL.YS..KLV	.FG.APEFAT	KGSTPYDFID	PDN.WG.RAG	..AHPVGY	LDILM-RQKE	HQL..ET.SD	.Y.HVGSGLAM	[560]	
AED99793_CP_TVV4-OC3	VL.YS..KLV	.FG.APEFCS	KGSTPYDFID	PDN.WG.RAG	..AHPVGY	LDILM-R.KE	HQL..ET.SD	.Y.HVGSGLAM	[560]	
NP_620729_CP_TVV1-1	DFIESAITSS	WVSIDARKRN	G-----	RARKFR	TAFI	NRFHDPEFAY	MFGITGNIE	RMEGKVTNSI	AQEVGYLMMG	[640]
AAC55468_CP_TVV1-T5	E.....S..	.....VR.S	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[640]
ABC86750_CP_TVV1-IH2	N.....S..	.....T.....	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....L..	[640]
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	.....	.....	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[640]
AED99815_CP_TVV1-OC3	N.....S..	.....R..	-----	.T.....	.....	.....	.....	.....T.	S.....L..	[640]
AED99813_CP_TVV1-UH9	N.....S..	.....R..	-----	.....	.....	.....	.....	.....T.	S.....LH.	[640]
AED99817CP_TVV1-OC4	N.....S..	.....R..	-----	.T.....	.....	.....	.....	.....T.	S.....L..	[640]
AED99811_CP_TVV1-UR1	N.....	.....N.T..	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....E..T..	[640]
AED99819_CP_TVV1-OC5	N.....	.....N.T..	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....E..T..	[640]
TVV1-C344	.....G.....	.....	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	[640]
NP_624322_CP_TVV2-1	ANVINS.HNC	KTK.VNN.LR	ATFVRRPPGA	PHL.AD..I.	.....L..	AL..LAD..A	PLD.SHEY.V	LD.L...F..	[640]	
AED99809_CP_TVV2-OC5	ANVINS.HNC	KTK.VNS.LR	ATFVRRPAGA	PHL.AD..I.	.....L..	AL..LAD..A	PLD.SHEY..	LD.L...F..	[640]	
AED99805_CP_TVV2-UR1	ANVINS.HNC	KTK.VNS.LR	TAFVRRPPGA	PPL.AD..I.	.....L..	AL..LAD..A	PLD.THEY..	LD.L...F..	[640]	
AED99807_CP_TVV2-OC3	ANVINS.HNC	KTK.VNN.LR	ATFVRRPPGA	PHL.AD..I.	.....L..	AL..LAD..A	PLD.THEY..	LD.L...F..	[640]	
TVV2-C76	ANVINS.HFC	KTK.VNN.LR	ATFVRRPPRA	PHL.AD..I.	.....L..	AL..LAD..A	PLD.SHEY.V	LD.L...F..	[640]	
TVV2-C351	ANVINS.HNC	KTK.VNN.LR	ATFVRRPPGA	PHLISD..I.	.....L..	AL..LAD..A	PLD.SHEY.V	LD.L...Y..	[640]	
NP_659389_CP_TVV3-1	AN..TSLFT.	GTNVLNHRMQ	KDFARDTPKP	GTLRHQH.I.	....E..Y..	RL..LA..VI	PLS.SFEVD.	LK.AEL.VT.	[640]	
AED99803_CP_TVV3-OC5	AN..TSLFT.	GTEVINQRMQ	NDFARDTPKP	GTLRHQH.I.	....E..Y..	RL..LAD..I	PLS.SFEVD.	LK.AER.IT.	[640]	
AED99801_CP_TVV3-OC3	AN..TSLFT.	GTNVLNHRMQ	NDFARDTPKP	GTLRHQH.I.	....E..Y..	RL..LAD..I	PLG.SFEVD.	LK.AER.IT.	[640]	
AED99799_CP_TVV3-UR1	AN..TSLFT.	GTNVLNHRMQ	KDFARDTPKP	GTLRHQH.I.	....E..Y..	RL..LAD..I	PLS.SFEVD.	LK.AER.IT.	[640]	
AED99797_CP_TVV4-OC5	SN.MAS.A..	GTEVLNQ.MQ	KSFVRRGNQV	..LRHSH.I.	....E..Y..	RL..LAD..M	PLS.THKCD.	ID.ATR.LE.	[640]	
AED99795_CP_TVV4-1	SN.MASVA..	GTEVLNQ.MQ	KSFVRRGNQV	..LRHSH.I.	....E..Y..	RL..LAD..M	PLA.THKCD.	ID.ATR.LQ.	[640]	
AED99793_CP_TVV4-OC3	AN.MAS.A..	GTEVLNQ.MQ	KSFVRRGNQV	..LRHSH.I.	....E..Y..	RL..LAD..I	PLA.THKCD.	ID.ATR.LQ.	[640]	

NP_620729_CP_TVV1-1	GDLRNCPILR	TLKAAEREET	VTFMCKEK--	----VGSLYA	IDGTVRVFKR	FETIDLAQLG	WTSHGKVMKP	YAFRAPVIQG	[720]
AAC55468_CP_TVV1-T5	.....V..	.....D..	I.....--	----..IF.	.....L.Q	YQ....S...	.....	.....	[720]
ABC86750_CP_TVV1-IH2	.....V..	.....G..	I.....--	----..F.	.....	Y.....	.....IM..	.....	[720]
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	.....V..	.....	.....TQ.--	----	.....	YQ.....	.....LM..	.....	[720]
AED99815_CP_TVV1-OC3	.....V..	.....D..	I.....--	----A.T.I.	M.....F...	.....T...	.....L.N.	.....	[720]
AED99813_CP_TVV1-UH9	.....V..	.....D..	I.....--	----A.T.F.	M.....M.W...	.....T...	.....I...	.....	[720]
AED99817CP_TVV1-OC4	.....V..	.....D..	I.....--	----A.T.M.	M.....I.W...	.....TH..	...R.....	.....I...	[720]
AED99811_CP_TVV1-UR1	.....	.....A...	.....TG.--	----I..IF.	...M.T...	YQ....E..	.....	.....	[720]
AED99819_CP_TVV1-OC5	.....	.....A...	.....TG.--	----I..IF.	V...M.TL.	YQ.V...D..	.....	.....	[720]
TVV1-C344	.....	.....	.....L.....	----	.....	.....	.....P.....	.....	[720]
NP_624322_CP_TVV2-1	..I...FG.N	A.NTRGLGQI	.HIRP.REPG	KRPRR.FYTT	L..Q.HPVTQ	DAPL.EIYH-	.RD..NLTR.	.SCHILDS..	[720]
AED99809_CP_TVV2-OC5	..I...FG.N	A.NTRGLGQI	.HIRP.REPG	KRPRR.FYTT	L..Q.HPVTQ	DAPL.EIYQ-	.RD..NLTR.	.SCHILDS..	[720]
AED99805_CP_TVV2-UR1	..I...FG.N	A.NTRGLGQI	.HVRP.REPG	KRPRR.YYTT	L..Q.HSVTQ	DAPL.EIYH-	.RD..NLTR.	.SCHILDSE.	[720]
AED99807_CP_TVV2-OC3	..I...FG.N	A.NTRGLGQI	.HVRP.RDPG	KKPRR.FYTT	L..Q.HPITH	DAPL.EIYQ-	.RD..NLTR.	.SCHILDSE.	[720]
TVV2-C76	..I...SFG.N	A.NTRGLGQI	.HIRP.REPG	KRPRR.FYTT	L..Q.HPVTQ	DAPL.EIYH-	.RD..NLTR.	.SCHILDS..	[720]
TVV2-C351	..I...FG.N	A.NTRGLGQI	.HIRP.REPG	KRPRR.FYTT	L..Q.HPVTQ	DAPL.EIYH-	.RD..NLTR.	.SCHILDS..	[720]
NP_659389_CP_TVV3-1	E.I..L.G..	C.CTRGLDAI	LGLRPVQQ--	KRKKMCFRT	L..NFHEVTI	RSETRDL.V-	.RD..YLAR.	..CHIIDSE.	[720]
AED99803_CP_TVV3-OC5	E.I..L.G..	C.CSRGLDAI	LGLRPIQQ--	KRKKMCFRT	L..NFHEVTI	RSETRDL.V-	.RD..YLAR.	..CHIVDSD.	[720]
AED99801_CP_TVV3-OC3	E.I..L.G..	C.CSRGLDAI	LGIRPVQQ--	KRKKMSYFRT	L..FHEVTI	RSDTHDL.V-	.ND..YLAR.	..CHIVDSD.	[720]
AED99799_CP_TVV3-UR1	E.I..L.G..	C.CSRGLDAI	LGLRPIQQ--	KRKKMCFRT	L..NFHEVTI	RSETRDL.V-	.RD..YLAR.	..CHIVDSD.	[720]
AED99797_CP_TVV4-OC5	E.I..L.G..	C.RGRGLDAI	.GIRPIN.--	KRR--AGF.T	L..NFH.VTN	QS.S.IL.V-	.ND..YIAR.	..CHIVESIN	[720]
AED99795_CP_TVV4-1	E.I..L.G..	C.RGRGLDAI	.GIRPIN.--	KRR--AGF.T	L..NFH.VTN	QC.S.VL.V-	.ND..YIAR.	..CHIVESIN	[720]
AED99793_CP_TVV4-OC3	E.I..L.G..	C.RGRGLDAI	IGIRPIN.--	KRR--AGF.T	L..NFH.VTN	QC.S.VL.V-	.ND..YIAR.	..CHIVESIN	[720]
NP_620729_CP_TVV1-1	MTICS---TA	YTSTAIIDIIT	TVFGPLRLRV	GSLFE-----	-----	[765]			
AAC55468_CP_TVV1-T5	I...N---..	..T.....V.	.....Q..	.T...-----	-----	[765]			
ABC86750_CP_TVV1-IH2	...N---..	...D..VV.	.....YH.	.A...-----	-----	[765]			
ABF57712_CP_TVV1-Changchun	...N---..	...D..V.	.....N..	.....-----	-----	[765]			
AED99815_CP_TVV1-OC3	I...N---..	..T.....V.	.....Q..	.....-----	-----	[765]			
AED99813_CP_TVV1-UH9	I...N---..	..T.....V.	.....Q..	.....-----	-----	[765]			
AED99817CP_TVV1-OC4	I...N---..	..T.....V.	.....Q..	.....-----	-----	[765]			
AED99811_CP_TVV1-UR1	I.V.K---..	.....V.	.....	.T...-----	-----	[765]			
AED99819_CP_TVV1-OC5	I.V.K---..	.....V.	.....	.T...-----	-----	[765]			
TVV1-C344	.....	.....	.....	.....	.....	[765]			
NP_624322_CP_TVV2-1	LEFADVSNGR	SRGKILVVVN	SPLKTCAYQ	.PS.APKPGS	AMWNE	[765]			
AED99809_CP_TVV2-OC5	LEFADVSNGR	SRGKILVVVN	SPLKTCAYQ	.PS.APKPGS	AMWNE	[765]			
AED99805_CP_TVV2-UR1	LQFADVSNGR	TRGKILVVVN	.PLKTSAYQ	.PS.APKPGS	AMWNE	[765]			
AED99807_CP_TVV2-OC3	LEFADVSNGR	SRGKLLVVV.	.PLKTSAYQ	.PS.APKPGS	AMWNE	[765]			
TVV2-C76	LEFADVSNGR	SRGKILVVVN	SPLKTCAYQ	.PS.APKPGS	AMWNE	[765]			
TVV2-C351	LEFADVSNGR	SRGKILVDVF	SPVKTCAYQ	.PS.APKPGS	AMWNE	[765]			
NP_659389_CP_TVV3-1	IEFYDKSNGL	.KGRVNVLS	GFAI.G.AYQ	.PRLQVATMA	AQI--	[765]			
AED99803_CP_TVV3-OC5	IEFYDKSNGL	.KGRVNVLS	GFAI.G.AYQ	.PRLQVATEA	AQI--	[765]			
AED99801_CP_TVV3-OC3	IEFYDKSNGL	.KGRVNVLS	GFAI.G.AYR	.PRLPVATEA	AQV--	[765]			
AED99799_CP_TVV3-UR1	IEFYDKSNGL	.KGRVNVLS	GFAI.G.AYQ	.PRSQVATEA	AQI--	[765]			
AED99797_CP_TVV4-OC5	VE.YDKSNG.	.EGWIQALVG	GFGV.E.CYM	.PRLQVAGGA	PSAL-	[765]			
AED99795_CP_TVV4-1	VE.YDKSNG.	.NGWIQALVG	GFGV.E.CYM	.PRLQVAGGA	PSAL-	[765]			
AED99793_CP_TVV4-OC3	VE.YDRSNG.	.NGWIQALVS	GFGV.E.CYM	.PRLQVAGGA	PSAL-	[765]			

**Anexo 4. Conservación de la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN entre los VTVs. Las secuencias de RdRp están alineadas. Las regiones conservadas para las 4 especies de VTVs están sombreadas en gris.**

NP_620730_RdRp_TV1-1	-----	-----	MEASANGLSHDDN	ANKSQNVG	PS	TLPRSDKQGG	EKHENSFN	--	-----	-----	[ 80]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 80]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 80]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 80]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	-----	-----	.....	.TR.....	.....	...G.....	.....	--	-----	-----	[ 80]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	-----	-----	.....	.....E..	.TR.....	...G.....	.....	--	-----	-----	[ 80]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	-----	-----	.....	.....E..	.TR.....	...G.....	.....	--	-----	-----	[ 80]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	-----	-----	.....	.....	.....	...G.....	.N.....	--	-----	-----	[ 80]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	-----	-----	.....	.....	.....	...G.....	.N.....	--	-----	-----	[ 80]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 80]
NP_624323_RdRp_TV2-1	-----	-----	-MASTLISSD	NSAT.GK.SE	VINNT.TS.P	DN.S..HSNP	RLTKVLDEMS	KK-----	-----	-----	[ 80]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	-----	-----	-MASTLISSD	NSAT.GK.SE	VINDTDTS.P	DN.P..HSNP	QLTKILDEMS	KK-----	-----	-----	[ 80]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	-----	-----	-MASTLISSD	NSAT.GKVNE	VINNTDTS.P	DTSPG.HSNP	RLTKILDEMS	KK-----	-----	-----	[ 80]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	-----	-----	-MASTLISSD	NSATSGTVGE	VINNTDTS.P	DT.P..HSNP	RLTKILDEMS	KK-----	-----	-----	[ 80]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 80]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 80]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 80]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	MSAPEP----	--LNTEVRSP	-----	DGVSE	.TET..LAIT	QSRV.N----	--EKITDTQS	DLQTLKKQSQ	-----	-----	[ 80]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	MSAPEP----	--LNTEVRSP	-----	NGVSE	.TET..LAVT	QSSV.N----	--EKTIDTQS	DLQTLKKQLQ	-----	-----	[ 80]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	MSAPEP----	--LNTEVRSP	-----	NGVSE	.KET..LAIT	QSGV.N----	--EKITDTQS	DLQTLKKQLQ	-----	-----	[ 80]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	MSAIATTIAS	ANLNDSRS.	N.PQNEGVPA	LAPQ..NAKP	NTGPP.PGE.	T.QQTNSSL	SANDFTKEHT	PATTIQKDTT	[ 80]		[ 80]
AED99796_RdRp_TV4-1	MSAITATISS	ANLNDSRS.	N.QQNGVPA	LAPQ..IAKP	NTGPP.PGD.	TRQQTIPSSP	KTDDHTKEPV	SAPTTQQNVT	[ 80]		[ 80]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	MSAIAATISS	ANLNDSRSL.	G.QPKEGVPA	PVLQ..IATP	KTGPP.PGE.	TRKQTTDSPH	SANPSTKEHT	PAPTIQPDTP	[ 80]		[ 80]
NP_620730_RdRp_TV1-1	-----	--SFSNDFFF	NFLRMSTNTH	ISDSPGVSVFV	AKDGTPTYSSL	TIPSGVGRLT	HNVVASAVQL	NITASNTLEV	[ 160]		[ 160]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 160]		[ 160]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 160]		[ 160]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 160]		[ 160]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	-----	--...Y....	.....AH..	.....	G.....TA	..Q.A.....	...I.....	.V..D.V...	[ 160]		[ 160]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	-----	-----	.....IAQ..	.....	I G.....T	...A.....	.....	.V..D.V...	[ 160]		[ 160]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	-----	-----	.....AQ..	...N.....	I G.....A	...A.....	.....	.V..D.V...	[ 160]		[ 160]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	-----	--.....	.....T.S..	.....	S.....TA	..Q.A.....	.....	...N.....	[ 160]		[ 160]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	-----	--.....	.....T.S..	.....	L.....TA	..Q.A.....	.....	...N.....	[ 160]		[ 160]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 160]		[ 160]
NP_624323_RdRp_TV2-1	-----	--PCV.INEI	RKMIRNFQPQ	FIQPRNGNRP	NAQPRT--VD	SFEWV.RIQS	TVETQLLGAT	.TVPQQ..NL	[ 160]		[ 160]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	-----	--PCA.INEI	RKMIRNFQPQ	FIQLRNGNRP	NAQPRT--VD	SFEWV.RIQS	TVETQLLGAT	.TVPQQ..NL	[ 160]		[ 160]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	-----	--PCV.INEI	RKMIRNFQPQ	.IQPRNGNRP	.NQPRT--VD	SFEWV.RIQS	TVNTQLLGAT	.TIPEQ..NL	[ 160]		[ 160]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	-----	--PCV.INEI	RKVIRNFQPQ	.IQPRNGNRP	GAQPRT--VN	SFEWV.RIQS	TVNTQLLGAT	.TIPEQ..NL	[ 160]		[ 160]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 160]		[ 160]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 160]		[ 160]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 160]		[ 160]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	-----	--PV.RSTD.	ET.YNYFYGL	DVSPSTDRIG	NAITRNTPVT	DTNEV.SFPL	TAS.SHTFSN	SPVPAHIQPL	[ 160]		[ 160]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	-----	--PVTRSTD.	ET.YNYFYAL	NVSPSTDRIG	NAITRNTPVN	DTNEV.SFPL	TAS.SHTFSN	TPVPAHIQPL	[ 160]		[ 160]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	-----	--PV.RSTD.	ET.YNYFYGL	QVPASTDRIG	NAIQRNIPVN	DTNEV.SFPL	TAS.SHTFSN	TPVPAHIQPL	[ 160]		[ 160]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	IPNTDLPSSSE	EGPRTHSTD.	QT.YEYFYYSY	PVPASQTRTG	GAI TRNGPVN	DNNEV.SFT.	ETALVTSLTP	RHIDT.IQPL	[ 160]		[ 160]
AED99796_RdRp_TV4-1	TSDKELPDSA	EGPRTHSTD.	QT.YEYFYYSY	PVPASQTRTG	GAIARNGPVN	DNNEV.SFT.	ETQLVTSLTP	RHIDA.IQPL	[ 160]		[ 160]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	TPITDHSNSE	EGPRTHSTD.	QT.YEYFYYSY	PVPASQTRTG	GAIARAGPVN	DNNEV.SFT.	ETALVTSLTP	KHIDA.IQPL	[ 160]		[ 160]

NP_620730_RdRp_TV1-1	DYFGQDVS	TTGTIPIPIF	DGEKYKETAR	ALAAIFSKKG	MSVDVTSQTV	QETLKNSDLT	IATVAAGYYT	ALAARHELTK	[ 240]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 240]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 240]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 240]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	..... SA...T....	.....	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	[ 240]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	..... S...T....	.....	...T.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	[ 240]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	..... S...T....	.....	.....N...	.....	.A.....	.....	.....	.....	[ 240]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	..... A...T....	.....V..	..SLV....	.....	.AL.....	.D.M....	.....	.....	[ 240]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	..... A...T.V.	.....V..	..SL.....	TAI.T...I	.D.....	.....	.....	.....	[ 240]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 240]
NP_624323_RdRp_TV2-1	.IS.TD.STT	I.PASIPGSI	SMLDNSRHIP	.IQSMIQNFK	ARYLGSL.DT	AQLQSPQYPQ	LLAYLF.QLI	.IKD.LD.FR	[ 240]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	.IS.TD.STT	I.PASIPGSI	SMLDNSRHIP	.IQSMIQNFK	ARYLGSL.DA	AQLNSPQYPQ	LLAYLF.QLI	.IKD.LD.F.	[ 240]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	.IS.TD.STT	I.PASIPGSI	SMLDNSRHIP	.IQSMIQNFK	ARYLGNL.DT	AQLNSPQYPQ	LLAYLF.QLI	.IKD.LD.FR	[ 240]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	.IS.TD.STT	I.PASIPGSI	SMLDNSRHIP	.IQSMIQNFK	ARYLGNL.DT	AQLNSPQYPQ	LLAYLF.QLI	.IKD.LD.FR	[ 240]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 240]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 240]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 240]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	QISIAD.CIN	YELDESGTLC	PALDSSVHVQ	RATSLA.ALK	VKLTGEIMHS	SSVRPIQTPQ	LIAYLY.VLL	.VKD.INIHR	[ 240]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	QISIAD.CVN	YELDESGTLC	PALDSSVHVQ	RATSLA.ALK	VKLTGEVMHS	ASVRPIQTPQ	LIAYLY.VLL	.VQD.LNIHR	[ 240]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	QISVAD.C?N	YELDESGTLC	PALDSSVHVQ	RATSLA.ALK	VKLTGEVMHS	ASVRPIQTPQ	LIAYLY.VLL	.VQD.LNIHR	[ 240]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	QISIAD.CVN	YSCQYSGQTC	PIFDGSQHVQ	SAT.LA.SMK	ARLMCEVTQS	LSARPVQQPQ	.IAYLY.ALL	.GD.LNIHY	[ 240]
AED99796_RdRp_TV4-1	QISIAD.CVN	YSCQYSGQTC	PVFDGSQHVQ	SAT.LA.SMK	ARLMCEVTQS	LSARPVQQPQ	VIAYLY.ALL	.FGD.LN.HY	[ 240]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	QISIAD.CVN	YSCQYSGQTC	PIFDGSQHVQ	SAT.LA.SMK	ARLMCEVTQS	LSARPVQQPQ	LIAYLY.ALL	.FGD.LNIHY	[ 240]
NP_620730_RdRp_TV1-1	DVSEAAHTIP	FVTALSDTFS	AALNAQRTSH	VISSCLRCPN	SRNAQRDIVI	GTVLWNNVVF	ESLSEHNMAV	PNPNDISFFI	[ 320]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 320]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 320]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 320]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	E..M.....	.....	..PD...S..	.....H	.N.I.H..G.	..DI...S.	....PQ....	.....V....	[ 320]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	Q..V.S....	.....L.	..QG...S..	.....H	.N.V.H.VG.	..DM...S.	....PQ....	.....V....	[ 320]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	Q..V...S..	....I...LA	..QD...S..	.....H	CN...H..G.	..NM...S.	....PQ....	.....	[ 320]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	EA.V...R..	.....T	..D...S..	.....A	.N....QVTV	..NM.T..S.	.N.AVQGA.I	....V....	[ 320]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	AE.T...R..	.A.....	..GD.L.S..	.....A	.N....QVTV	..NM.T..S.	.NIAVQGLII	....V....	[ 320]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 320]
NP_624323_RdRp_TV2-1	PSNPLSLADA	LFGFTLAQNA	RPRYDDHRHA	KACQGPLVIP	AATNSDCGPC	.F.QI.ANQG	LT.PLGACLF	V..ETVNDQS	[ 320]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	PSNPLSLADA	IFGFTLAQHA	HPRYDDHRHA	KACTGPLVIP	AATNSDCGPC	.F.QI.ANQA	LT.PLGACLF	V..ETVNDQS	[ 320]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	PSNPLSFADA	LFGFTLAQHA	HPRYDDHRHA	KACTGPIVIP	AATNADCGPC	.F.QI.ANQG	LT.PLGACLF	V..ETVNDQS	[ 320]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	PSNPLSFADA	LFGFTLAQNA	RPRYDDHIHA	KACTGPIVIP	AATNADCGPC	.F.QI.ANQG	LT.PLGACLF	V..DTVNDQS	[ 320]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 320]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 320]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 320]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	-NQPTNLWRS	LCA.GRAAQA	KPFFDEIPNN	KFRPGALVAP	PLPEAGFGPF	PAEGL.QNSK	LDFKAKAYVF	YKQRTYNPDD	[ 320]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	-NQHTNLWRS	LCA.GRAAQA	KPFFDEIPNN	KFRTGALLAP	PLPDAGFGPF	PAEGL.QNSK	LDFKSKGYIF	YKQRTYNPDD	[ 320]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	-NQPTNLWRS	LCAPGRAAQA	KPFFDEFANN	KFRAGPLLAP	PLPDAGFGPF	PAEGL.QNSK	LDFKSKGYIF	YKQRTYNPDD	[ 320]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	-GNKVNWLNA	LLGHNLQRGA	PINGENFNH.	LLIDGPLA.P	ILP.AGLGPF	PSTTLGPNTT	VTFKARASIF	VR.QTYDYAL	[ 320]
AED99796_RdRp_TV4-1	-GNKVNWLNA	LLGHNLQRAT	PVNGDAFNH.	LLIDGALA.P	ILP.AGLGPF	PSTTLGPNTT	VTFKARASIF	VR.QTYDYAL	[ 320]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	-GNKVNWLNA	LLGHNLQRGT	PINGDNFNH.	LLIDGPLA.P	ILP.AGLGPF	PSTTLGPNTT	VTFKARASIF	VR.QTYDYAL	[ 320]

NP_620730_RdRp_TV1-1	PNKALSSSW	CAIWLLNAFL	HSFIAPTRIH	IFITQG--ET	YHLAPFTDSD	VYEA VRFLLA	MSKSSRPME	SVESMLYAYG	[ 400]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 400]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 400]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 400]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.....P....	.....I	...V...F.	...AP.--..	.....A.	I...IPIM..	...AA..V..	.....	[ 400]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.....PPP..	.....I	...V...F.	...AP.--..	.....A.	...IPIM..	...AA..V..	.....	[ 400]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.....PPP..	.....I	...V...H..	....P.--..	.....A.	I...IPIM..	...AA..V..	.....	[ 400]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.....P....	.....	...V.Q..F.	....P.--..	.N.....A.	I...IPV...	.....V..	.....	[ 400]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	...S.PP...	.....	....Q....	....P.--..	.N.....A.	I...IPI..G	...T...V..	.....	[ 400]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 400]
NP_624323_RdRp_TV2-1	FQDF.WLIFA	THHRMP.QMQ	NNWPFSLN.V	STCAAPGRQA	P.AGEL..ER	.RL.LDTGHR	ILL.MFNDD	ETLRYQQRK.	[ 400]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	FQDF.WLVFA	THHRMP.QMQ	NNWPFALN.V	STCAAPGRQA	P.AGEL..ER	.RL.LDTGHR	ILLAMFNDD	ETLRYQQRK.	[ 400]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	FQDF.WLIFA	THHRMP.QMQ	NDWPFALN.V	STCAAPGRQA	PQAGQ..EAR	.KL.LDTGHR	ILL.MFNDD	EALRYQQRK.	[ 400]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	FQDF.WLIFA	THHRMP.QMQ	NNWPFALN.V	STCAAPGRQV	PQAGQL..AR	FHA.LDTGHR	ILL.MFNDD	ETLRYQQRK.	[ 400]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 400]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 400]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 400]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	M.R.FWFI.A	IYNRMP.D.Q	N.YPLNITFC	TSELPVQSPM	PTADGISAEQ	CDK.LLL.DK	IVLEFFNDR	KLAYYYVFK.	[ 400]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	M.R.FWFI.A	IYNRMPED.Q	N.YPLNITFC	TSELPVQSPM	PAADGISAEQ	CDR.LVL.DK	VILEFFNDR	KLAYYYVFK.	[ 400]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	M.R.FWFL.A	IYNRMPGE.Q	QYQLNITFC	TSELPVQNPI	PNADGISNEQ	CEK.LLL.EK	IILELFNDR	KLAYYYIFK.	[ 400]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	VDA.FWLIYA	MYSRMPV..R	Q.YSLNIDFF	TVQPMAACVF	PGHDG..TPV	IDQ.LGV.ES	.LVEMFNGDR	EIMYYYAFK.	[ 400]
AED99796_RdRp_TV4-1	VDA.FWLIYA	MYSRMPV..R	QAYSLNVDF	TVQPMAACVF	PGHDG..TPV	IDQ.LGV.ES	.LVEMFNGDR	QIMYYYAFK.	[ 400]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	VDA.FWLIYA	MYSRMPV..R	QAHSLNIDFF	TVQPMAACVF	PGHDG..TPV	IDQ.LGV.ES	.LVEMFNGDR	EIMYYYAFK.	[ 400]
NP_620730_RdRp_TV1-1	TQMIIQPHSL	YTEGGLIRRM	IFTVPHLPAH	GYFVTNSEFS	RYMNIAPVDD	PRSAKDFVIG	AGTGLLQIVL	AYQAAFSCAG	[ 480]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 480]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 480]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 480]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.....	.....K.	.....	.....Y.	.....N.	.....I..	.....T.	.....	[ 480]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.....	.....	.....	.....Y.	.....N.	.....I..	.....T.	.....	[ 480]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.....	.....K.	.....	.....Y.	.....N.	.....I..	.....I.	.....	[ 480]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	...V.....	.....I..K.	.....	.....A.Y.	.....N.	..T...YI..	V.....VI.	.....G.	[ 480]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	A..V.....	.....IV..	.....	...IA.T.Y.	.....N.	..T...YI..	V.....I.	.....	[ 480]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 480]
NP_624323_RdRp_TV2-1	IETMFR.CCF	.....L.KA	TRY.SMV.LN	.LYYY.GAT.	YVVSPIHT.A	HPGITAAIES	FVD-----IM	VL..V..FS.	[ 480]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	IETMFR.CCF	.....L.KA	TRY.SMV.LN	.LYYY.GAT.	YIVSPIHT.A	HPGITAAIES	FVD-----IM	VL..V..FT.	[ 480]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	IETMFR.CCF	.....L.KA	TRY.SMV.LS	.LYYY.GAS.	YVVSPIHT.A	HPGITAA.ES	FVD-----IM	VL..V..FS.	[ 480]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	IETMFR.CCF	.....L.KA	TRY.SMV.LS	.LYYY.GAS.	YIVTPIHT.A	HPGITAAIES	FVD-----IM	VL..V..FT.	[ 480]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 480]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 480]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 480]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	S.FVMR.C.C	.Q.....KA	SRN.ALRAFT	.IYYLAGFAE	Q.A.MISCAS	HPGIIGALFQ	YVD-----TM	VL..V..LS.	[ 480]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	C.FVMR.C.C	.Q.....KA	SRN.ALRAFT	.IYYLAGFAE	Q.A.MISCAT	HPGIIGALFQ	YVD-----TM	VL..V..LS.	[ 480]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	S.FVMR.C.C	.Q.....KA	SRN.ALRAFT	.IYYLAGFAD	Q.A.MISCAA	HPGVIGALFQ	YVD-----TM	VL..V..LS.	[ 480]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	G.VFMR.C.C	.Q.....KA	SRN.SLASFT	.IYSLIGYCA	PEARPLHAAN	HPGIIAALFQ	YVD-----TM	VL..VL.YS.	[ 480]
AED99796_RdRp_TV4-1	G.LFMR.C.C	.Q.....KA	SRN.SLASFT	.IYSLIGYCA	PDARPLHAAS	HPGIIAALFQ	YVD-----TM	VL..VL.YS.	[ 480]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	G.IFMR.C.C	.Q.....KA	SRN.SLASFT	.IYSLIGYCA	PEARPLHAAN	HPGIIAALFQ	YVD-----TM	VL..VL.YS.	[ 480]

NP_620730_RdRp_TV1-1	PIALHWHAND	AISQGMDRV	SIYLEGRYFT	IPMAVNVATN	VAQYTTMVRA	DPEYRHTLDR	ILPRIFGPST	DTVDFIESA	[ 560]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 560]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 560]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 560]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.....	.....TI.	ET..Q....	V...A....	.....L...	..Q.....	.....	....N....	[ 560]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.....D..	.....TI.	.T.....	..I..A....	.....	..Q.....	.....	....N....	[ 560]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.....	.....TI.	GT.....	....A....	.....LI.T	..Q....E.	.....	...YN....	[ 560]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.....	...H...T..	AA.....	....I....	I....G...	..Q.K.S...	.....	....N....	[ 560]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	.....D..	...N...T..	AA.....	.....	I....R...	..Q.K....	.....	....N....	[ 560]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 560]
NP_624323_RdRp_TV2-1	.KVVAKV.A	SQIDAAMVFG	PAVA..DG.V	YDPLRPAPP-	LSAFY.EFIH	R.AEQRIFQM	AMSQ.Y.SHA	PLIIANVINS	[ 560]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	.KVVAKV.A	NQLDPAMIFG	PAIAD.DG.V	YDPLRPAPP-	LSAFYSEFIH	R.AEQRIFQM	AMSQ.Y.SHA	PL.IANVINS	[ 560]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	.KVVAKVDA	NQDASSVFG	PAVA..DG.V	YDPRRPAPP-	LSAFY.EFIH	R.AEQRIFQM	AMSQ.Y.SHA	PLIIANVINS	[ 560]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	.KVVAAR.DA	NQVDASSVFG	PAVA..DG.V	YDPRRPAPP-	LSAFYSEFIH	R.AEQRIFQM	AMSQ.Y.SHA	PLIIANVINS	[ 560]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 560]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 560]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 560]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	.KLVRF.A.PP	EYQGRHACPF	.FVADEN.WG	.APGS.AEP-	.GM.Y.EIIQ	RKTEHNLFTE	TFMD.Y.STA	SVICAN..TS	[ 560]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	.KLVRF.A.PP	EYQGRHACPF	.FVADEN.WG	.APGSDAEP-	.GM.YMDIIQ	RKAEHDLFTE	TFMD.Y.STA	SIICAN..TS	[ 560]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	.KLVRF.A.PP	EYQGRHACPF	.FVADEN.WG	.APGS.AEP-	.GM.YMDIIQ	RKSEHNLFVD	TFMD.Y.STA	SIICAN..TS	[ 560]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	.KLI.FG.AP	EFATKGSTPY	NFIDPDN.WG	.RAG..AHP-	.GY.YLDILM	RQKEHQL..E	T.SD.Y.HVG	SLAMSN.MAS	[ 560]
AED99796_RdRp_TV4-1	.KLV.FG.AP	EFATKGSTPY	DFIDPDN.WG	.RAG..AHP-	.GY.YLDILM	RQKEHQL..E	T.SD.Y.HVG	SLAMSN.MAS	[ 560]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	.KLV.FG.AP	EFCSKGSTPY	DFIDPDN.WG	.RAG..AHP-	IGY.YLDILM	R.KEHQL..E	T.SD.Y.HVG	SLAMAN.MAS	[ 560]
NP_620730_RdRp_TV1-1	ITSSVWSID-	-----AR	KRNGRARKFR	TAFINRFHDP	EFAYMFGITG	NGIERMEGKV	TSNIAQEVYD	LMNGGDLRNC	[ 640]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 640]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 640]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 640]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.S.....-	-----..	R....T....	.....	.....	.....	..T.S....	.L.....	[ 640]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.S.....-	-----..	R....T....	.....	.....	.....	..T.S....	.LH.....	[ 640]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.S.....-	-----..	R....T....	.....	.....	.....	..T.S....	.L.....	[ 640]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.....N-	-----T	.....	.....	.....	.....	.....E.	.T.....	[ 640]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	.....N-	-----T	.....	.....	.....	.....	.....E.	.T.....	[ 640]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 640]
NP_624323_RdRp_TV2-1	.HNCKTK.VN	NKLRATFVR.	PPGAPHL.AD	..I.....	.L..AL..LA	D..APLD.SH	EY.VLD.L..	.F...I...	[ 640]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	.HNCKTK.VN	SKLRATFVR.	PAGAPHL.AD	..I.....	.L..AL..LA	D..APLD.SH	EY..LD.L..	.F...I...	[ 640]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	.HNCKTK.VN	SKLRTAFVR.	PPGAPPL.AD	..I.....	.L..AL..LA	D..APLD.TH	EY..LD.L..	.F...I...	[ 640]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	.HNCKTK.VN	NKLRATFVR.	PPGAPHL.AD	..I.....	.L..AL..LA	D..APLD.TH	EY..LD.L..	.F...I...	[ 640]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 640]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 640]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 640]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	LFT.GTEVIN	QRMQNDFARD	TPKPGTLRHQ	H.I....E.	.Y..RL..LA	D..IPLS.SF	EVD.LK.AER	.IT.E.I..L	[ 640]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	LFT.GTNVIN	KRMQNDFARD	TPKPGTLRHQ	H.I....E.	.Y..RL..LA	D..IPLG.SF	EVD.LK.AER	.IT.E.I..L	[ 640]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	LFT.GTNVLN	ERMQKDFARD	TPKPGTLRHQ	H.I....E.	.Y..RL..LA	D..IPLS.SF	EVD.LK.AER	.IT.E.I..L	[ 640]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	.A..GTEVLN	QKMQKSFVR.	GNQV..LRHS	H.I....E.	.Y..RL..LA	D..MPLS.TH	KC..ID.ATR	.LE.E.I..L	[ 640]
AED99796_RdRp_TV4-1	VA..GTEVLN	QKMQKSFVR.	GNQV..LRHS	H.I....E.	.Y..RL..LA	D..MPLA.TH	KCD.ID.ATR	.LQ.E.I..L	[ 640]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	.A..GTEVLN	QKMQKSFVR.	GNQV..LRHS	H.I....E.	.Y..RL..LA	D..IPLA.TH	KCD.ID.ATR	.LQ.E.I..L	[ 640]

NP_620730_RdRp_TV1-1	PILRTLKAAE	REETVTFMCK	EKVGSLY AID	GTVRVFKRFE	TIDLAQLG--	---WTSHGKV	MKPYAFRAPV	IQGMTICSTA	[ 720]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 720]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 720]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 720]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.V.....	.D..I.....	.A.T.I.M.	....F.....	....T...--	-----	.....L	.N.I...N..	[ 720]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.V.....	.D..I.....	.A.T.F.M.	..M.W.....	....T...--	-----	.....I	...I...N..	[ 720]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.V.....	.D..I.....	.A.T.M.M.	..I.W.....	....TH...--	-----R...	.....I	...I...N..	[ 720]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.....	A.....T	G.I..IF...	..M.T...YQ	....E...--	-----	.....	...I.V.K..	[ 720]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	.....	A.....T	G.I..IF.V.	..M.TL..YQ	.V...D...--	-----	.....	...I.V.K..	[ 720]
TV1-C344	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 720]
NP_624323_RdRp_TV2-1	FG.NA.NTRG	LGQI.HIRP.	REP.KRPRRG	FYTTLDGQVH	PVTQDAPLDE	IYH.RD..NL	TR..SCHILD	S..LEFADRF	[ 720]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	FG.NA.NTRG	LGQI.HIRP.	REP.KRPRRG	FYTTLDGQVH	PVTQDAPLDE	IYQ.RD..NL	TR..SCHILD	S..LEFADV	[ 720]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	FG.NA.NTRG	LGQI.HVRP.	REP.KRPRRG	YTTTLDGQVH	SVTQDAPLDE	IYH.RD..NL	TR..SCHILD	SE.LQFADV	[ 720]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	FG.NA.NTRG	LGQI.HVRP.	RDP.KKPRRG	FYTTLDGQVH	P.THAPLDE	IYQ.RD..NL	TR..SCHILD	SE.LEFADV	[ 720]
TV2-C76	-----	-----	-----	-----	-----	---RFQPT.	TR-----	-----	[ 720]
TV2-C351	-----	-----	-----	-----	-----	---RFQRT.	TR-----	-----	[ 720]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 720]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	.G..C.CSRG	LDAILGLRPI	QQ--KRKKMC	YFRTLDGN.H	EVTIRSETRD	LQV.RD..YL	AR...CHIVD	SD.IEFYDKS	[ 720]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	.G..C.CSRG	LDAILGIRPV	QQ--KRKKMS	YFRTLDGT.H	EVTIRSDTHD	LQV.ND..YL	AR...CHIVD	SD.IEFYDKS	[ 720]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	.G..C.CSRG	LDAILGLRPI	QQ--KRKKMC	YFRTLDGN.H	EVTIRSETRD	LQV.RD..YL	AR...CHIVD	SD.IEFYDKS	[ 720]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	.G..C.RGRG	LDAILGIRPI	N.--KRR--A	.FYTL DGN.H	VVTNQSTSDI	LQV.ND..YI	AR...CHIVE	SINVE.YDKS	[ 720]
AED99796_RdRp_TV4-1	.G..C.RGRG	LDAILGIRPI	N.--KRR--A	.FYTL DGN.H	VVTNQCTSDV	LQV.ND..YI	AR...CHIVE	SINVE.YDKS	[ 720]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	.G..C.RGRG	LDAILGIRPI	N.--KRR--A	.FYTL DGN.H	VVTNQCTSDV	LQV.ND..YI	AR...CHIVE	SINVE.YDRS	[ 720]
NP_620730_RdRp_TV1-1	YTSTAIIDIIT	TVFGLRLRV	GDPFLSKAVR	CGPVI PSVKH	HFNINYL SIL	KHNG-----	-----NEYT	FVPGYGWVLQ	[ 800]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	-----	-----	-V.....	.....F.I.	...FRRVTTT	.RRR-----	-----K.V	L.....	[ 800]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	-----	-----	-V.....	....V..I..	...FKHVIDI	.G.-----	-----N..	.I.....	[ 800]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	-----	-----	-.....	...IV.....	...VWY...	.RK.-----	-----K...	.I.....	[ 800]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	..T.....V.	.....Q.-	VGSL.....	.....A...	...FKNVIVA	TR.N-----	-----S...	.I.....	[ 800]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	..T.....V.	.....Q.-	VGSL.....	...I..TI..	...FKHVITA	.R.D-----	-----V..	.I.....	[ 800]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	..T.....V.	.....Q.-	VGSL.....	...I..T...	...FKHVITD	.R.D-----	-----I..	.I.....	[ 800]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.....V.	.....-	VGTL.....	...I.....	...RRIITV	.R.-----	-----V..	.I.....	[ 800]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	.....V.	.....-	VGTL.....	...I...R.	...RHIIITV	.R.-----	-----V..	.I.....	[ 800]
TV1-C344	-----	-----	-----	.....M..V...	.....	-----	-----	-----	[ 800]
NP_624323_RdRp_TV2-1	QRTVTRKDPC	GRQLTPQDMR	CL.GPQLRAK	A.QRHVERIN	QCGGSVIYPR	LSTARACSL-	-----SAIDK	MTLALAHQ.C	[ 800]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	NGRSRGK.LV	V.NS..KTCA	AYQGPQLRAN	A.QRHVERIN	QCGGSVIYPR	LSTARARSS-	-----SAID.	MTLTLANQ.C	[ 800]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	NGR.RGK.LV	V.NT..KTSA	AYQGPQLRAK	A.QRYVERIN	QCGGDVIYPR	LSTARACSS-	-----SATDS	TTSTLATQ.C	[ 800]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	NGRSRGKLLV	V.TT..KTSA	AYQGPQLRAK	A.QRYVERIN	QCGG.VIYPR	LSTARACSS-	-----SAIDS	KTLTLANQ.C	[ 800]
TV2-C76	-----KDPC	GRQLTPQDMR	CL.GPQLRAK	A.QRHVERIN	QCGGSVIYPR	LSTARACTK-	-----SAIDL	MTKALAHQ.W	[ 800]
TV2-C351	-----KDPC	GRLLTGQDMR	CL.GPQLRAK	A.QRHVERIN	QCGGSVIYPR	LSTARACSL-	-----SAIDK	MTLALAYQ.C	[ 800]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 800]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	NGLYKGRVNV	LIS.FAIPGR	AYQGP.L.GS	NRGRPD-LSD	VPATGS..N.	ISLSKASRLP	YRKRQNGVRV	SDYTVARE.A	[ 800]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	NGLYKGRVNV	LIS.FAIPGR	AYRGP.L.GS	NRGRPS-LSD	IPATGS..N.	IDLSKASRLP	YRKLKEGLRA	SDYTVARE.A	[ 800]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	NGLYKGRVNV	L.S.FAIPGR	AYQGP.L.GS	NRGRPD-LSD	VPATGS..N.	IYLSKASRLP	YRKLKEGVRA	ADYTVARE.A	[ 800]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	NGAYEGW.QA	L.G.FGVPER	CYMGP.S.GS	RRRPLCPL.G	SNCAA.HVD	GQLYRASRLP	YRKLTTSHLN	CSKHCARQ.A	[ 800]
AED99796_RdRp_TV4-1	NGAYNGW.QA	L.G.FGVPER	CYMGP.S.GS	RRRPLCPL.G	SNRAVA.HVD	GQLDRASRVP	YRKLAPCHLN	CSKR CARQ.A	[ 800]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	NGAYNGW.QA	L.S.FGVPER	CYMGP.S.GS	RRRPLCPL.G	SNCAVA.HVD	GQLTRASRVP	YRKLTPSHLN	CSKR CARQ.A	[ 800]

NP_620730_RdRp_TV1-1	DDYLLNAVKM	VGEGDLPPNQ	LPYDDDLLFT	YAKILLYDYI	SHFPEFRHK-	----NPRLLT	SETELQLFPL	KENSAARTKA	[ 880]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	...V.S...	T...N.....	...H.....	.....	.Y..K...N-	----.D..D	HK...E....	.AD...N..	[ 880]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	.....S....	T.....D.....	.....L.....	.....	T...KH.Y.-	----.KI..	P.....	.TD...N.V	[ 880]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	.....S....	A...V.....	...N...IS..	LT.....	.....YT-	----.KI..	Q.....	.ID.....	[ 880]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.....S....	T...I..D..	.....LS	.....	T...KY.YN-	----.KI..	QT.....	.DD...N.V	[ 880]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.....S....	T...I..D..	.....LS	.....	T...KY.YN-	----.KI..	Q...I....	.D...N.V	[ 880]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.....S....	T...I..D..	.....LS	.....	T...KH.YN-	----.KI..	Q.....	.DD.....V	[ 880]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	...V.S...	T..DQ....	...G...LI	.SE...N..	.L..K..Y.-	----.D..N	Q.....	.TD...N..	[ 880]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	...V.S...	T.VDQ....	...G...I	.E...N..	.L..K..Y.-	----.D..N	Q.....	.TD...N..	[ 880]
TV1-C344	.....S....	T...I..D..	.....LS	.....	T...KH.YN-	----.KI..	Q.....	.DD.....V	[ 880]
NP_624323_RdRp_TV2-1	YL.KSSDLHR	QLDTMI.QSY	.TFLEW..R-	IDPHNEKSS.	R...SQDNHE	VITHSLN..	K.Q.IT...I	.DIVQ.NRRV	[ 880]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	YL.KSSDLHR	QLDIMI.QSY	.TFLEW..R-	ISPNEINS.	R...SQDNHE	IITCTLN.S	K.Q.IM...I	.DIIQ.NRRV	[ 880]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	YL.KSSDLHR	QLDITI.QSY	.TFIEW..R-	MNPDNEKNS.	R...NHDDHE	VITCSLN..	K.Q.IE...I	.DIIQ.NRRV	[ 880]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	YL.KSSDLHQ	QLDFTI.QSY	.TFLEW..R-	MNPDNQKSS.	R...NYDNQE	VITCLN..	K.Q.IE...I	.DIIQ.NRRV	[ 880]
TV2-C76	YL.KSSDLLR	QLPTMI.HSY	KTFLVW..R-	IDPHNEKSS.	R...SQDNHE	VITHSLN..	K.QDFT...I	IDIVQ.KGRV	[ 880]
TV2-C351	YL.KSTDLHR	QLDTMI.QSY	.TFLEW..S-	FDPHNKSS.	R...SQDFHE	VITHSLSF..	K.Q.IT...I	.DIVQ.NRRV	[ 880]
NP_659390_RdRp_TV3-1	-----	-MDHVSIAIY	.NFLRWV.LP	.NGQTRPHP	.VWRQTPYPE	HVN--LKF.N	K.M.E....	.KAPQ.DL.V	[ 880]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	CAFRNSRLTR	QMDHVTDIAY	.NFLRWV.LP	.NGQTVRPHP	TEWQTPYPE	HVN--LKF.S	K.M.E....	.KAPQ.DL.V	[ 880]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	SAFRNSRLTR	QMDHVTDIAY	.NFLRWV.LP	.NGQTRPHP	.KWSPTPYPE	HVN--LKF..	K.I.E....	.KAPQ.DL.V	[ 880]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	CAFRNSRLTR	QMDHVTDIAY	.NFLRWV.LP	.NGQTRPHP	TMWRQTPYPE	HVN--LKF.S	K...E....	.KAPQ.DL.V	[ 880]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	VI.RYQTLSP	QLTEVSDADY	.AFLRWV.LP	.TGATNRPHP	KRW.KPFYPR	EVN--LKF.D	K.....	.KVPQ.DL.V	[ 880]
AED99796_RdRp_TV4-1	VI.RYQTLSP	QLPEVSDADY	.AFLRWV.LP	.TGATNRPHP	KRW.KPFYPR	EVN--LKF.D	K.....	.KVPQ.DL.V	[ 880]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	VI.RYQTLSP	QLTEVSDSDY	.AFLRWV.LP	.TGATNRPHP	KRW.KPFYPA	EVN--LKF.D	KK.....	.KAPQ.DL.V	[ 880]
NP_620730_RdRp_TV1-1	NFYARTLWNE	TTSD---KS	AFKPGTYNDT	VAGLLMWQQC	ALMWSLPKLI	INKIISGVC	ALTEKVSILT	LKRISDWLQ	[ 960]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	.....D	.IT.----.	.....	.....L....	.....SV	.RT.....	...NRT...	.....	[ 960]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	.....S....	.T.----.	.....	.....	.....HSV	.T.....	...DRT..A.	.....	[ 960]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	.....D	LAT.----.	.....P...	.....	.....T.....	...RT...	.....	.....	[ 960]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.....L....	A...----.K	.....	.....	.....V.QS	.RV.....	...DRT..A.	.....	[ 960]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	...T.L....	A...----.K	.....	.....	.....I.QS	.RT.....	...DRT...	.....	[ 960]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.....L....	A...----.T	.....	.....	.....V.QS	.RV.....	...DRT..A.	.....	[ 960]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.....S....	AKT.----.T	.....	.....	.....RSV	.RT.....	...RT..A.	.....	[ 960]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	.....S....	AKT.----.T	.R.....	.....	.....RSV	.RT.....	...RT..A.	.....	[ 960]
TV1-C344	.....S....	T...I..D..	.....LS	.....	T...KH.YN-	----.KI..	Q.....	.DD.....V	[ 880]
NP_624323_RdRp_TV2-1	.A...N.LDA	SPLPDFALQQ	MLL.N.A..V	.CAI.LLGEV	LW.LRC.IS.	.VN.SRAI.R	ND-----SF	.DL..FN.M	[ 960]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	.A...N.LDA	SPLPDFALQQ	MLL.N.A..V	.CAI.LLGEV	LW.LRC.IS.	.VN.SRAI.R	ND-----SF	.DL..FN.M	[ 960]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	.A...N.LDA	SPLPDFALQQ	MLL.K.A..V	.C.I.LLGEV	LW.LRC.IS.	.VG.SRAI.R	ND-----SF	.DL..FN.M	[ 960]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	.A...N.LDA	SPLPDFALQQ	MLL.K.A..V	.C.I.LLGEV	LW.LRC.IS.	.VG.SRAI.R	ND-----SF	.DL..FN.M	[ 960]
TV2-C76	.G.G.N.LDG	SPLPDFALQQ	MLL.N.A..V	.CAI.LLGEV	LS.LRS.IS.	.VN.SRAI.R	ND-----S.	.DL..FN.M	[ 960]
TV2-C351	.A...N.LDA	SPLPDGALQL	MLL.N.A..V	.CAI.LLGDV	LW.LRC.IS.	.VN.SRAI.G	ND-----SF	.VL..FN.M	[ 960]
NP_659390_RdRp_TV3-1	.C...NVLAS	.ELTDDLL.Q	SLPI.LN..S	.C.IVIVLEL	LRIAGV.SKL	LPI.GQAIAN	KD-----PF	.I.E..FN.M	[ 960]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	.C...NILAS	.ELTDDLL.R	CLPV.LN..S	.C.IVIVLEL	L.IAGV.SKL	LPV.GQAIAN	KD-----PF	.I.E..FN.M	[ 960]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	.C...NILAS	.ELTDDLL.Q	CLPV.LN..S	.C.IVIVLEL	L.IAGV.SKL	LPI.GQAIAN	KD-----PF	.I.E..FN.M	[ 960]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	.C...NILAS	.ELTDDIL.Q	SLPI.LN..S	.C.IVIVLEL	L.IAGV.SKL	LPV.GQAIAN	KD-----PF	.I.E..FN.M	[ 960]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	.CF..N.LYS	SPLSDRIL.Q	CIPV..N..	.C..IILLEL	LFEAGV.LDL	LPI.SVAIAK	ND-----PF	.V.AL..FN.M	[ 960]
AED99796_RdRp_TV4-1	.CF..N.LYS	SPLSDRVL.A	CIPV..N..	.C..VILLEL	LFEAGV.LDL	LPT.SVAIAK	ND-----PF	.V.AL..FN.M	[ 960]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	.CF..N.LYS	SPLSDRIL.Q	CIPV..N..	.C..VILLEL	LFEAGV.LDL	LPT.SVAIAK	ND-----PF	.V.AL..FN.M	[ 960]

NP_620730_RdRp_TV1-1	LGLAYSPIFR	LFIELPTLLG	RGAI PGDAAL	DMKHRLT-YN	PLMTVDVPKT	QLHDLIYRLL	SRNYNNTKI-	SSF EHHLEER	[1040]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	...C...H.	.....	.....DK	.I...A-FD	.SI.....E	...L.....	...L.I..V-	N.....	[1040]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	...F...H.	.....	.....N.IK	.I...FK-FD	.SI.....D	L..S.....	...LDIS.K-	N.....	[1040]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	.....	.....	.....ST.	.I...R-..	.SI.....D	.....	...L.GM.A-	D.....	[1040]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.....H.	.....	.....N.I.	.I...-FD	.SI.....TD	R..R.....	...LHI.TA-	...D.....	[1040]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.....H.	.....	.....H	.I...-FD	.SI.....TD	...R.....	...L.I.TV-	D...D.....	[1040]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.....H.	.....	.....IH	.I...K-FD	.SI.....TD	...R.....	...LKV.TL-	D...D.....	[1040]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	...C...H.	.....	.....SVK	.....K-FD	.SI.....RD	.....	...LHI.NV-	E..D.....	[1040]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	...C...H.	.....	.....NVK	.....K-FD	.SI.....D	E..A.....	...L.I..V-	D.....	[1040]
TV1-C344	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1040]
NP_624323_RdRp_TV2-1	..TKI..AN	CLT..N..Q.	..VTSS..KR	.LT..IA-DV	NPHEAKISRE	N.REA.NQIY	KEEITRKEVP	DT.KQ.VFTS	[1040]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	..TKI..AN	CLT..N..Q.	..VTSS..KR	.LT..IA-DV	NPHEAKISRE	N.KEA.NQIY	REEITKKE.P	DT.RQ.VFTS	[1040]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	..TKI..AN	CLT..NS.Q.	..VTSS..KR	.LT..ID-DV	NPHEAKISRE	N.KQA.NNIY	REEISKKEVP	DT.KQ.VFSS	[1040]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	..TKI..AN	CLT..NS.Q.	..VTSS..KR	.LT..ID-DV	NPHEAKISRE	I.KEA.NHIY	KEEI.K.EVP	DT.KQ.VFSS	[1040]
TV2-C76	...PRI..AN	CLT..N..Q.	..VTSS..KR	.LT..RA-DV	NPHEAKISRE	N.TEA.NQIY	KEEISRKEVP	DT.KQDVFTF	[1040]
TV2-C351	..TKI..LAN	CLT..N..QS	..VTSS..GKS	.FTYLIA-DV	NPHEAKISRE	N.REAM.QIC	KEEITRKEVP	D..KQ.VFTS	[1040]
NP_659390_RdRp_TV3-1	I.ATT.R.AN	ILT.CN..I.	..VKSS.PSA	.LY..VAPEG	NRHEAKISRH	I.IEA.NKIY	KNEMTDMPPP	GD.KL..ITS	[1040]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	I.ATS.R.AN	ILT.CN..I.	..VKSS.PSA	.LY..VAPEG	NRHEAKISRH	I.IEA.NKIY	KNEMTDMPPP	GD.ML..ITS	[1040]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	I.ATT.R.AN	ILT.CN..I.	..VKSS.PSA	.LY..VAPEG	NRHEAKISRH	I.IEA.DKIY	KNEMTSMPPP	GD.ML..ITS	[1040]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	I.ATT.R.AN	ILT.CN..I.	..VKSS.PSA	.LY..VAPEG	NRHEAKISRH	I.IEA.NKIY	KNEMTDMPPP	GD.ML..ITS	[1040]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	T.ATT.H.AN	.LT.CT....	..VAGSEPNV	.LY..VAPEG	NPHEAKISDD	V.RSA.RTIY	KQEIKDCKPK	GD.RL..LTS	[1040]
AED99796_RdRp_TV4-1	T.ATT.N.AN	.LT.CT....	..VTASAPSA	.LY..VAPEG	NRHEAKISDD	V.YSA.RTIY	KQEIKDCKPK	GD.GL..LTS	[1040]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	T.ATT.H.AN	.LT.CT....	..VTASAPNA	.LY..VAPEG	NRHEAKISDD	V.RSA.RTIY	KQEIKDCKPK	GD.GL..LTS	[1040]
NP_620730_RdRp_TV1-1	LLWSRSGSHY	YPDEQIDQLL	PPQPTRKEFL	DIVTIDYIKQ	CKPQVFIRQS	RKLEHGKERF	IYNCDTISYV	YDFVFLKLEF	[1120]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	...K.....	...DK.NE..	.....	.V..TE...E	.....	.....	.....V...	...I.....	[1120]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	...K...F	...M.....	.K.....	.V..A.....	.A.RTY....	.....	.....	...I.....	[1120]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	...K...F	...DN.....	.R.....	...T...E	.....	.....	.....	...I.....	[1120]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	...KT.....	...DEVNK..	.HR.....	...V...R	.....	.....	.....	...YI.....	[1120]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	...K.....	...DEVNK..	.HR.....	...V...R	.....	.....	.....	...YI.....	[1120]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	...K.....	...DEVNK..	.HR.....	...V...R	.....	.....	.....	...YI.....	[1120]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	...K.....	...EVNR..	.N.....	.V..V...E	.....	.....	...V...	...I.....	[1120]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	...K.....	...DR.N..	.K.....	.V..V...E	...H.....	.....	.....	...I.....	[1120]
TV1-C344	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1120]
NP_624323_RdRp_TV2-1	P..VKK.A.H	H.-----F	GSYDN.L.V	EN.DL.RVLK	SH.A.Y.T.A	P.....T..	.....V..I	...YI.NYI.	[1120]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	P..VKK.A.H	H.-----HF	KSYDN.L.V	EN.DL.EVL	SR.A.Y.T.A	P.....T..	.....V..I	...YI.NYV.	[1120]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	P..VKK.A.H	H.-----HF	ESYDN.L.V	EN.NL.RVL	SH.A.Y.T.A	S.....T..	.....I	...YI.NYI.	[1120]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	P..VKK.A.H	H.-----HF	KSYDN.L.V	EN.DL.RVL	SH.A.Y.T.A	S.....T.Y	.....V..I	...YI.NYV.	[1120]
TV2-C76	P..VKK.G.H	H.-----F	GSYDN.L.LV	ENLEL.RVLK	SQAA.Y.T.A	PL.....T.L	.....V..I	F..YI.NYI.	[1120]
TV2-C351	GY.EKK.A.H	H.-----F	GSYDNVL.CV	EN.DL.RVLK	SHRA.Y.T.A	P.....T..	.....V..I	...YN.NYI.	[1120]
NP_659390_RdRp_TV3-1	P..CKA...H	H.-----HF	AKYSS.LD.V	MD.PA.K.AA	VP.S...T.A	E.....T.Y	.....V..L	F..YI.HYV.	[1120]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	P..CKA...H	H.-----HF	AKYGS.L.V	MD.PA.K.AA	EP.A.Y.T.A	E.....T.Y	.....A..L	F..YI.HYV.	[1120]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	P..CKA...H	H.-----HF	AKYDS.L.V	MD.PA.K.AA	EP.SAY.T.A	E.....T.Y	.....V..L	F..YI.HYV.	[1120]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	P..CKA...H	H.-----HF	AKYDS.L.V	MD.PA.K.AV	EA.S.Y.T.A	E.....T.Y	.....V..L	F..YI.HYV.	[1120]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	PF.CK...H	H.-----EF	.SYRN.L.V	MNTDP.N.IA	V..S.Y.T.A	Q.....T.Y	.....V..L	...YI.NYI.	[1120]
AED99796_RdRp_TV4-1	PF.CK...H	H.-----EF	.SYRN.L.V	MNTDP.S.AA	V..S.Y.T.A	Q.....T.Y	.....V..L	...Y.NYI.	[1120]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	PF.CK...H	H.-----QF	.RYRN.L.V	MNTDPSA.MA	V..S.Y.T.A	Q.....T.Y	.....V..L	...YI.NYV.	[1120]

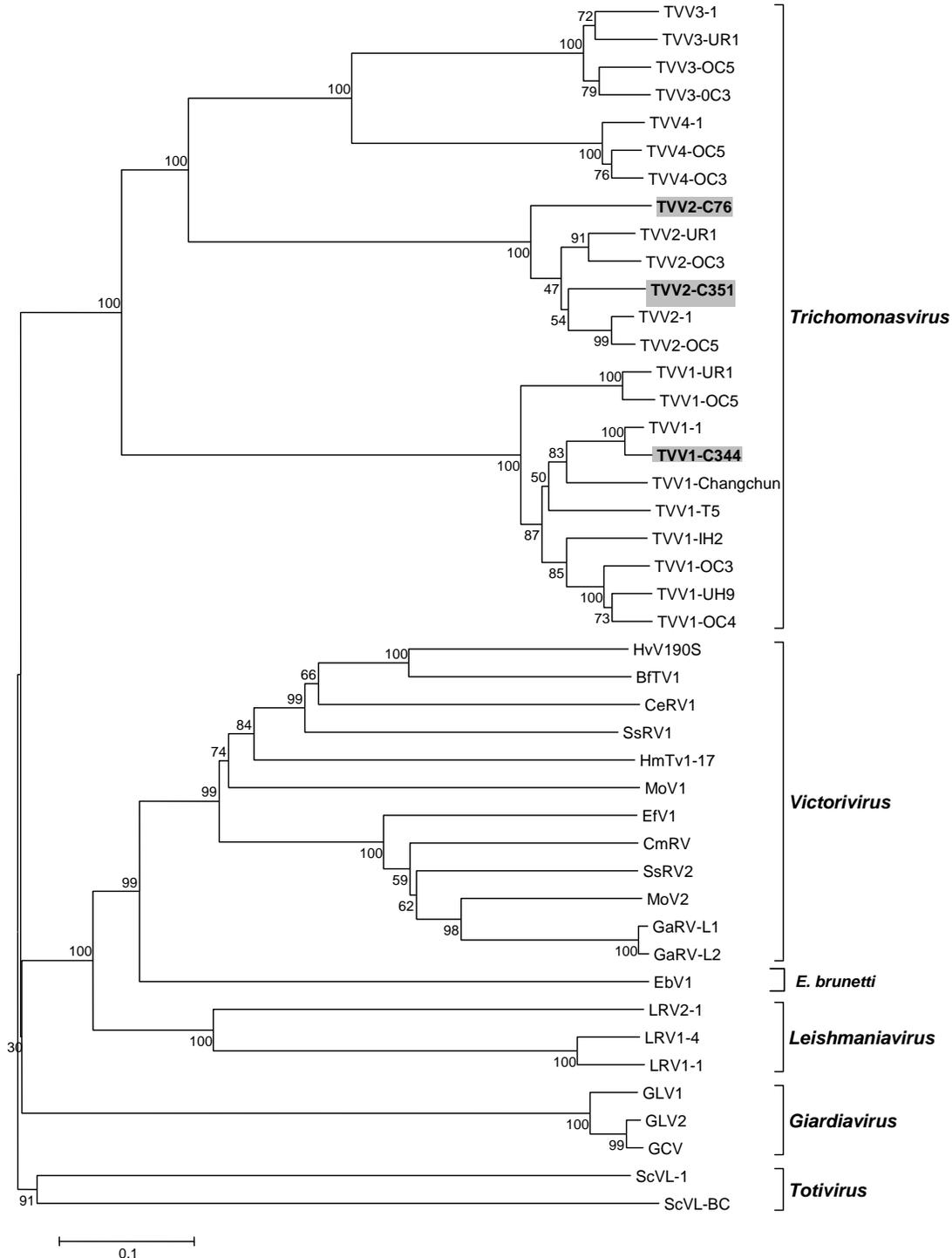
NP_620730_RdRp_TV1-1	SGWQDSEAIL	SPGDYSSECL	HAKISGYKYK	AMLDTDFNS	QHTIQSMRLI	FETMKELLPP	EASFALDWCI	ASFDNMQTSD	[1200]	
AAC55469_RdRp_TV1-T5	T.....	T..R.	.....S	.....	.....	.....	..T.....	.....	[1200]	
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	T....R....	T..R.	..TR..S	.....	.....E...V	.....S	..TA.....	.....T.	[1200]	
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	.....	T..Q.	.....R	.....	.....	.....	..T.....	.....	[1200]	
AED99816_RdRp_TV1-OC3	T....G....	TNDR.	.....S	.....	.....	.....	..M.....	.....K..	[1200]	
AED99814_RdRp_TV1-UH9	T.....	TNDR.	..T..S	.....	.....E....	.....S	..T.....	.....K..K	[1200]	
AED99818_RdRp_TV1-OC4	T.....	TN.R.	.....S	.....	.....E....	.....S	..TA.....	.....R..S	[1200]	
AED99812_RdRp_TV1-UR1	A.....	TG.R.	..R..S	.....	.....R....	.....	..TT.....	.....Y..	[1200]	
AED99820_RdRp_TV1-OC5	A.....	T..R.	..TR..N	.....	.....	.....	..TT.....	.....Y..	[1200]	
TV1-C344	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....R..	[1200]	
NP_624323_RdRp_TV2-1	.V.SNKHVL.	N.DYMNPFVIF	ST--LN.DEY	C.....	..S.E..KQV	.LCLFPF..R	SMHSI.Q..V	T....YIN-	[1200]	
AED99810_RdRp_TV2-OC5	GV.SNKHVL.	N.DYMNPFVIF	ST--LN.DEY	C.....	..S.E..KQV	.SSLFPF..T	SMHRI.Q..V	T....YIN-	[1200]	
AED99806_RdRp_TV2-UR1	GV.SNKHVL.	N.DYMNPIIF	SS--LD.SEY	C..F.....	..S.EN.K.V	.SCLMPF..Y	SMHSV.Q..V	T....YIN-	[1200]	
AED99808_RdRp_TV2-OC3	.V.SNKHVL.	N.DYMNPFVIF	SS--LN.DEY	C.....	..S.A..K.V	.SCLMPF..Y	SMHSV.Q..L	T....YIN-	[1200]	
TV2-C76	.V.SKKHVL.	N.DYMNPFVIF	ST--LN.DEF	C.....	..S.E..KQV	.LFLFPF.LW	SMHSI.RG.V	T....YIN-	[1200]	
TV2-C351	NV.SNIHVL.	KTFYMFVVV	SR--LN.DEY	C...F....	..LS.E..KQV	.LCLFPF..R	SMHSI.Q..V	T....YMN-	[1200]	
NP_659390_RdRp_TV3-1	CV.SNESVL.	N.AAM.V.RF	SV--LD.PEY	C.I.....	..SLE.QK.V	..CLRPHY..S	.MHPI....	..M.H.EIG-	[1200]	
AED99804_RdRp_TV3-OC5	CV.SNESVL.	N.AAM.V.RF	SV--LD.PEY	C.I.....	..SLE.QK.V	..CLRPHY..S	.MHPI....	T.M.H.EIN-	[1200]	
AED99802_RdRp_TV3-OC3	CV.SNESVL.	N.AAM.V.RF	SV--LD.PEY	C.I.....	..SLE.QK.V	..CLRPHY..R	.MHSV....	..M.H.EIN-	[1200]	
AED99800_RdRp_TV3-UR1	CV.SNESVL.	N.AAM.V.RF	SI--LD.PQY	C.I.....	..SLE.QK.V	..CLRPHY..S	.MHPV....	..EH.EIN-	[1200]	
AED99798_RdRp_TV4-OC5	.I.AN.HVL.	N.DALNA.KF	AT--LE.PKY	C.I.....	..LT..KVV	..VL..F..S	.MFPV....	T....TIR-	[1200]	
AED99796_RdRp_TV4-1	.I.AN.HVL.	N.DALNA.KF	AT--LE.PEY	C.I.....	..ALN..KAV	.KVL..F..S	.MFPV....	S....TIK-	[1200]	
AED99794_RdRp_TV4-OC3	.I.AN.HVL.	N.DALNA.KF	AT--LE.SEY	C.I.....	..LT..KAV	..VL..F..S	.MFPV....	S....TIK-	[1200]	
NP_620730_RdRp_TV1-1	GRKWTA	TLPS	GHRATTFINT	VLNWCYTQMV	GLKFDSFMCA	GDDVILMSQE	PISLAPILKS	QFKFNPSKQS	TGTRGEFLRK	[1280]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	.L..M.	.....	.....	.....	.....	.....Q	.....T.	H.....	.....	[1280]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	.K..V.	.....	.....	.....	.....E.....	.....HA	.....T.	P.....	.....	[1280]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	.H..V.	.....	.....	.....	.....T.....	.....L...	.....T.	.....	.....	[1280]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.H..V.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.	N.....	.....	[1280]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.H..V.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.	H.....	.....	[1280]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.H..V.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.	H.....	.....	[1280]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.H..VS.	.....	.....	.....	.....N.....	.....L...	.....V..T.	H.....	.....	[1280]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	.H..VS.	.....	.....	.....	.....N.....	.....L...	.....T.	H.....	.....	[1280]
TV1-C344	.....	.....	.....	.....	.....	.....V	.....T.	H.....	.....	[1280]
NP_624323_RdRp_TV2-1	KTH.NS.	.....S	..RA.LLPF	LQVANA.HTG	--DV.LCGK	ADYATL.NTV	PYEL.KT...	F.PSA....L	[1280]	
AED99810_RdRp_TV2-OC5	NTH.NS.	.....S	..RA.LLPF	LQVSNA.HTG	--DV.LCGK	ADYGTL.NTV	PYEL.KT...	F.PSA....L	[1280]	
AED99806_RdRp_TV2-UR1	NIH.KS.	.....S	..RA.LLPF	LQVSNA.HTG	--DV.LCGK	ADYATL.NTA	PYEL.KT...	F.PSA....L	[1280]	
AED99808_RdRp_TV2-OC3	NVH.KS.	.....S	I..RA.LLPF	LQVSNA.HTG	--DV.LCGK	ADYATL.NTV	PYEL.KT...	F.SSA....L	[1280]	
TV2-C76	KTH.NS.	.....L..S	..RA.KLPF	LQVANA.HTG	--DV.LCGK	ADYATL.NTV	PYEL.KT...	F.PSA....L	[1280]	
TV2-C351	KTH.GS.	.....E.....FS	.V.RA.LLPF	LQVCNA.HTP	--DV.KCGK	ADYRTL.KTV	PYELFKT...	F.PSP..R.L	[1280]	
NP_659390_RdRp_TV3-1	.QH.LS.	.....S	..KA.LIPY	IGDTT..H.G	--DV.LCGK	YDYQTL.DTL	PYEL.K....	F.PNA....L	[1280]	
AED99804_RdRp_TV3-OC5	.QH.LS.	.....S	..KA.LIPY	IGDTV..H.G	--DV.LCG	YDYQTL.DTL	PYEL.K....	F.PNA....L	[1280]	
AED99802_RdRp_TV3-OC3	.QH.LS.	.....S	..KA.LIPY	IGDTV..H.G	--DV.LCG	YDYQTL.DTL	PYEL.K....	F.PNA....L	[1280]	
AED99800_RdRp_TV3-UR1	.QH.LS.	.....S	..KA.LIPY	IGDAV..H.G	--DV.LCG	YDYQTL.DTL	PYEL.K....	F.PNA....L	[1280]	
AED99798_RdRp_TV4-OC5	DK..RS.	.....S	..RA.LLPY	IGTIV.YH.G	--DV.LCGD	YDYQNL.TRL	PYEL.....	F.PHA....L	[1280]	
AED99796_RdRp_TV4-1	NT..RS.	.....S	..RA.LLPY	IGTIV.YH.G	--DV.LCGD	YDYQNL.TRL	P.EL.....	F.PHA....L	[1280]	
AED99794_RdRp_TV4-OC3	DM..RS.	.....S	..RA.LLPY	IGTIV.YH.G	--DV.LCG	HDYQHL.TRL	PYEL.....	F.PHA....L	[1280]	

NP_620730_RdRp_TV1-1	HYTEAGVFAY	PCRAIASLVS	GNWLSESLRD	NTPILVPIQN	GIDRLRSRAG	LLGVPWKLGL	SELIEREAIIP	KDVSMALLNS	[1360]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	..S.....	.....	.....Q..E	.....	.....	.....	.....	..E.G.....	[1360]
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	..NE...V.	..T.....	..S..D..E	.....	.....	.....IS..	.....	..G.....	[1360]
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	...E....	...V....	...D...E	.....	.....	.....S...	.....	..E.G.....	[1360]
AED99816_RdRp_TV1-OC3	...E....	.....	...DT...MV	...V....	.....	.....I...	.....DL.	..E.G.....	[1360]
AED99814_RdRp_TV1-UH9	...AE....	.....	...T...MV	.....	.....	.....R...	.....D..	..E.G.....	[1360]
AED99818_RdRp_TV1-OC4	...AE....	.....	...T...MV	.....	.....	.....S...	.....G..	..E.G.....	[1360]
AED99812_RdRp_TV1-UR1	...SE....	..A.....	...Q...E	.....	.....	.....I...	...T...V.	R.....	[1360]
AED99820_RdRp_TV1-OC5	...TE....	..T.....	...Q...E	.....	..V.....	.....I...	...T...R.	R.....	[1360]
TV1-C344	...E....	...P....	...T...MV	..A....	.....	.....S...	...V...G.	EE.G.....	[1360]
NP_624323_RdRp_TV2-1	.KHNDQ.SG.	..A...S...	...FANPL	WQ.S.LS.MQ	QLYTISA.S.	..PYIPVTMK	L.VQR.YDLR	SRITNG.FSG	[1360]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	.KHNDQ.SG.	..A...S...	...FANPL	WQ.S.LS.MQ	QLYTISA.S.	..PYIPVTMK	L.VQR.YDLR	SRITNG.FSG	[1360]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	.KHNDQ.SG.	..A...S...	...YDNPL	WQ.S.LS.MQ	QLYTISA.S.	..PFVPVTMK	A.VRR.YDL	TRLTNG.FSG	[1360]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	.KHNDQ.SG.	..A...S...	...YDNPL	WQ.S.LS.MQ	QLYTISA.S.	..PTLPVTMK	L.VRR.YDL	TRLTNG.FSG	[1360]
TV2-C76	.KHNDQ.SG.	AA...S...	...FANPL	WQGS.LS.MQ	QNYTRSAWS.	..PYIPVSMK	K.VQR.NDLR	SRITNG.FSG	[1360]
TV2-C351	.KHNDL.SG.	..A..KSRC..	P...FAPPL	WQ.S.LSCMQ	QLYTISA.S.	..KPYIPVTLK	LGVQR.YDLR	SRITNG.FSG	[1360]
NP_659390_RdRp_TV3-1	.RRAGD.IG.	..S...VS...	...KTSWE	WQ.S.ISVT.	QCNVII..SQ	..NIRFIPAMQ	Q..RN.YDK	MSEPFVGS	[1360]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	.RRAGD.IG.	..S...VS...	...KTSWE	WQ.S.ISVT.	QCNVII..SQ	..NIRFIPAMQ	Q..RN.YDK	MSEPFVSSD	[1360]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	.RRAGD.IG.	..S...VS...	...KTSWE	WQ.S.ISVT.	QCNVII..SQ	..NIRFIPAMQ	Q..RN.YDK	MSEPFVSSN	[1360]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	.RCGD.IG.	..S...VS...	...KTSWE	WQ.S.ISVT.	QCNVII..SQ	..NIRFIPAMQ	Q..RN.YDK	MSEPFVSSN	[1360]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	.RHGEK.IG.	..T...S...	...TTSWN	WQ.S.LSVT.	Q.NAIIC.SQ	..SINRIRSLA	Q..RF.YCPL	F.GYIDPATT	[1360]
AED99796_RdRp_TV4-1	.RHGEK.VG.	..T...S...	...TTSWN	WQ.S.LS.T.	Q.NAIIC.SQ	..SIHTIRSLA	Q..RF.YCPL	L.DYIDPATT	[1360]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	.RHGEK.IG.	..T...VS...	...TTSWN	WQ.S.LS.T.	Q.NAIIC.SQ	..SISRIRSLA	Q..RF.YCPL	L.NYIDPATT	[1360]
NP_620730_RdRp_TV1-1	HAAGPLITR	DYSSFTVPT	PPKLH-SSLE	YTATRHLQD	LCKHVPWKQL	TANECNKLQ	QIKKMSHRHC	SQTKITYKCV	[1440]
AAC55469_RdRp_TV1-T5	.....K	...S-.T..	...Y....	..S.....	..TV.SD..SR	....I.Y...	..A...N.T	[1440]	
ABC86751_RdRp_TV1-IH2	.....N	..QVS-.T..	...Y....	.....N.	STT...R...	.....	..A...HYT	[1440]	
ABF57713_RdRp_TV1-Changchun	.....	...IS-.T..	.....	..S.....	..VE.....	.....	..A.....	[1440]	
AED99816_RdRp_TV1-OC3	.....K	...TIT-...	...V....	..S.....	..TQ...R...	.....	..A.....	[1440]	
AED99814_RdRp_TV1-UH9	.....K	...TIT-.T..	...Y.V..	..S.....	..LQ.....	.....	..A.....	[1440]	
AED99818_RdRp_TV1-OC4	.....K	...TIT-.T..	...Y.V..	..S.....	..TE.SR....	.....	..A.....I	[1440]	
AED99812_RdRp_TV1-UR1	.....N	...T.T-.T..	...Y.V..	..S.....E.	..LE.R...K	.....	..A...T..	[1440]	
AED99820_RdRp_TV1-OC5	.....N	...T-.T..	...F.V..	..S.....E.	..LE.R...K	.....	..A...T..	[1440]	
TV1-C344	.....K	...RIT-.T.D	...Y.V..	..ND.....	...P.....	.....	.....	[1440]	
NP_624323_RdRp_TV2-1	DIVPS.CPCY	KSNAALLSAV	V.DTVVKAPP	TFYDLRT.DI	.KQTS..INS	ASR-----YM	DLLERR.MES	DNKNVI.SIQ	[1440]
AED99810_RdRp_TV2-OC5	DIVPS.CPCY	KSNAALLSAV	V.DTVVKGSP	NFYDLRT.DI	.KQTS..INS	ASK-----YM	NLLZRR.MES	DNKNVL.SIQ	[1440]
AED99806_RdRp_TV2-UR1	EIVPS.CPCY	KSNAALLSAV	I.DTVLKAQP	KHYDLRT.DI	.KHTS..INS	ESK-----YF	DLLDRR.MES	.KKNVL.SIQ	[1440]
AED99808_RdRp_TV2-OC3	DIVPS.CPCY	KSNAALLSAV	I.DTVLKAQP	KHYDLRT.DI	.KHTS..INS	ESK-----YL	DLLDRR.MES	NKKNVL.NIQ	[1440]
TV2-C76	DIVPS.CPCY	KSNAALLSAV	V.DTVVKAPP	TFYDLRT.DI	.KQTS..INT	ASR-----YM	DLLEGR.KES	DNKNVI.SIQ	[1440]
TV2-C351	DIVPS.CPCY	KSNAALLSAV	D.DTVVKAPP	TFYDLRT.HI	.KHSS..INS	AST-----YM	DLLERR.MQS	DNKNVI.SIQ	[1440]
NP_659390_RdRp_TV3-1	YYVM..CPCY	SDAAT.IV.N	V.Q.EC.DVP	FSQAQKVFDT	MRDIC.EFTT	VND-----VI	DRVLARRTSN	AVKN...NVC	[1440]
AED99804_RdRp_TV3-OC5	YYVM..CPCY	SDAAT.IV.N	V...EH.DVP	FSQAQKLFDT	MRDSC.EFTT	VND-----II	DKVRARRSSS	AASN...NVG	[1440]
AED99802_RdRp_TV3-OC3	YYVM..CPCY	SDAAT.IV.N	V.Q.EH.DVP	FSQAQKLFDT	MRDYC.EFTT	VND-----VI	DKV.ARRSSS	AVSN.M.NVC	[1440]
AED99800_RdRp_TV3-UR1	YYVM..CPCY	SDAAT.IV.N	V.Q.ER.DAP	FSQAQKVFDA	MRDFC.EFTT	VGD-----VI	DKVRARRSSS	AVKN.M.DVC	[1440]
AED99798_RdRp_TV4-OC5	SFVAA.CPSY	QPTATMII.D	V.H.DAGEV.	FAQLHQLAKY	AINTY..LNS	VES-----VD	.LVRNRM.RP	AAQD.R.SIL	[1440]
AED99796_RdRp_TV4-1	SFVAA.CPSY	RPTATMIV.D	V.H.DAEV.	F.QL.RLAEY	AINTY..LNS	.ES-----VN	.LVRNRT.KP	AAKA.R.NIL	[1440]
AED99794_RdRp_TV4-OC3	SFVAA.CPSY	QPTATMI..D	V.H.DAEV.	F.QLHQLAEY	AINTY..LNS	VES-----VN	.LVRSRM.KP	AARD.H.SVL	[1440]

NP\_620730\_RdRp\_TV1-1 YEVEFKPSGLP TVLSEVSQSA LSLVWVQAML KEAMQDYSTK KKDAHMYACN ACTSSVSGDA FLRATSKMAG VLITSLISS [1520]  
AAC55469\_RdRp\_TV1-T5 .....R... ..GS..PS ..ML..... .Q.I..D... .I..R.F.A. ....NAS... ..T.. [1520]  
ABC86751\_RdRp\_TV1-IH2 H..... ..DA..PS ..M..... ..N... .I...F... ..GC..... ..NP.L... ..T.. [1520]  
ABF57713\_RdRp\_TV1-Changchun ..A...RK.. ..A... ..I...FV.. ..NP.L... ..T.. [1520]  
AED99816\_RdRp\_TV1-OC3 .....NR.. ..D...PS ..MA..... ..TV.. .I..Q.F.S. ....N..... ..P.... [1520]  
AED99814\_RdRp\_TV1-UH9 .....N... ..PS ..M..... ..V.. .I..Q.F.S. ....Q..P.... ..M....Y.. [1520]  
AED99818\_RdRp\_TV1-OC4 .....G...PS ..M..... ..N..V. .I..Q.F.S. ....Q..P.... ..M....Y.. [1520]  
AED99812\_RdRp\_TV1-UR1 H..Y..... K...GA..PS ..M..... ..N... .I..Q.F.SS ...DR..... ..Q.SA.A... ..Q.. [1520]  
AED99820\_RdRp\_TV1-OC5 HDFY..... ..GA..PS ..MA..... ..NF... .L..Q.F.S. ....DC..... ..Q.SA.T... ..F..S.L.. [1520]  
TV1-C344 .....G..... ..V..... [1520]  
NP\_624323\_RdRp\_TV2-1 .LPS.MLPMI D.DPADATPL RKRYHPRSHI AHPLPR---- --...LKELR FA.CR.GPAT AI.LG.LWPA NR.NLIKPVY [1520]  
AED99810\_RdRp\_TV2-OC5 .LPS.MLPPII D.DPADALPL QKRYHPRSHI AHPLPR---- --...LKELR FA.CR.GPAT AI.LG.LWPA NR.NLIKPVY [1520]  
AED99806\_RdRp\_TV2-UR1 .LPS.MLPPII D.DPTEAFPP QKRYHPRSHI AHPLPR---- --E..LKELR FA.CR.GPAT AI.LG.LWPA NR.NLIRPVY [1520]  
AED99808\_RdRp\_TV2-OC3 .LPS.MLPMI D.DPSEALPP QKRYHPRSHI AHPLPR---- --...LKELR FA.CR.GPAT AI.LG.LWPA NR.NLIRPVY [1520]  
TV2-C76 .LPS.MLPMI D.DPADATGL RKRYHGRSHI AHPLPR---- --.G.LKEFR FA.CR.GPAT A..LGGLWPA NR.NLIKPVY [1520]  
TV2-C351 .VPS.MLP.I D.DPADATPL RKRYHPRSHI AQGLPR---- --...LKELT FA.CR.RPAT AR.LG.LWPA KT.FVMMPVY [1520]  
NP\_659390\_RdRp\_TV3-1 AP.APQVCIA VNPAHYQFLL RKKYPREHI APPGF.---- --.STNSKLV FS.YDLAPSI AMKSCAVLTP AK.ICGHGLR [1520]  
AED99804\_RdRp\_TV3-OC5 SP.APQVCVV VNPNNYQFLL RKKYPREHI APPGF.---- --ASNDSKLV FT.YDLAPSI AMKSCAVL.P AK.ICGHGLR [1520]  
AED99802\_RdRp\_TV3-OC3 SP.APQVCVV VNPNNYQFLL RKKYPREHI APSGF.---- --ESSDSKLV FT.YDLAPSI AMKSCAVLTP AK.ICGHGLR [1520]  
AED99800\_RdRp\_TV3-UR1 AP.APRISIV VNPAHYQFLL RKKYPREHI APTGS.---- --NTDRTKLV FA.YDLAPSI AMKSCAVLTP AK.I.GHGLR [1520]  
AED99798\_RdRp\_TV4-OC5 GPAIPLVSYH HHCDFMVVPP ARRYPRDH. APPITP---- --QVLPPQPV F.DRDL.PII A.KIAPAGVA .KV.ADRPIA [1520]  
AED99796\_RdRp\_TV4-1 GSAVPLVCYH HHCDSMIVPL ARRYPRDH. APPVTP---- --QVLPPQPV F.DRNL.PII A.KIAPAGVA .KV.ADRPIA [1520]  
AED99794\_RdRp\_TV4-OC3 GPAIPLVSYH HHCDFMVVPL TRRYPRDH. APPITP---- --QVLPPQPV F.DRDL.PIM A.KIAPAGVA .KV.ADRPIA [1520]

NP\_620730\_RdRp\_TV1-1 S- [1522]  
AAC55469\_RdRp\_TV1-T5 .- [1522]  
ABC86751\_RdRp\_TV1-IH2 .- [1522]  
ABF57713\_RdRp\_TV1-Changchun .- [1522]  
AED99816\_RdRp\_TV1-OC3 .- [1522]  
AED99814\_RdRp\_TV1-UH9 .- [1522]  
AED99818\_RdRp\_TV1-OC4 .- [1522]  
AED99812\_RdRp\_TV1-UR1 .- [1522]  
AED99820\_RdRp\_TV1-OC5 .- [1522]  
TV1-C344 .- [1522]  
NP\_624323\_RdRp\_TV2-1 V- [1522]  
AED99810\_RdRp\_TV2-OC5 V- [1522]  
AED99806\_RdRp\_TV2-UR1 V- [1522]  
AED99808\_RdRp\_TV2-OC3 V- [1522]  
TV2-C76 V- [1522]  
TV2-C351 V- [1522]  
NP\_659390\_RdRp\_TV3-1 .G [1522]  
AED99804\_RdRp\_TV3-OC5 .G [1522]  
AED99802\_RdRp\_TV3-OC3 .G [1522]  
AED99800\_RdRp\_TV3-UR1 .G [1522]  
AED99798\_RdRp\_TV4-OC5 .A [1522]  
AED99796\_RdRp\_TV4-1 .A [1522]  
AED99794\_RdRp\_TV4-OC3 .A [1522]

**Anexo 7. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de CP y RdRp de los VTVs y otros miembros de la familia *Totiviridae* (listados en el anexo 4) obtenidos por el método de Evolución Mínima. En negritas se destacan las secuencias de VTVs que se informan en este trabajo. Los valores sobre las ramas son los valores bootstrap.**



**Anexo 8. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de CP y RdRp de los VTVs y otros miembros de la familia *Totiviridae* (listados en el anexo 4) obtenidos por el método de Máxima Parsimonia. En negritas se destacan las secuencias de VTVs que se informan en este trabajo. Los valores sobre las ramas son los valores bootstrap.**

