

# **EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DE ADN CONTRA LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN UN MODELO DE RATÓN**

**Mar Riera, Dante Orozco, José Jorge Prado Y Carlos Chávez**

Colegio Marymount, Estrella del Norte # 6, Col. Rancho Tétela, Cuernavaca  
Morelos. Teléfono: 31142-77  
E-mail: colegio@marymount.edu.mx

Asesor: Dr. Fernando Esquivel Guadarrama. Facultad de Medicina de la UAEM.

## **RESUMEN**

El rotavirus causa muchas enfermedades como dolores de estómago, diarrea, incluso puede causar la muerte. Sus capas externas (VP7 y VP4) se utilizan para realizar las vacunas que actualmente existen contra esta enfermedad. El problema es que estas dos capas externas están en constante mutación y por eso cada año se tiene que diseñar una nueva vacuna contra el rotavirus. Nuestro asesor al analizar el problema, realizó experimentos a base de plásmidos; los cuales son DNA circular, con las capas internas del rotavirus por separado, llamadas VP6 y VP2. Concluyó que la capa del VP6 da protección aunque no se compara con las vacunas que existen actualmente de VP7 y VP4; también concluyó que el VP2 por sí solo no produce ningún tipo de protección. Con esta información y junto con la ayuda de nuestro asesor realizamos otro experimento: inoculamos plásmidos a un grupo de ratones, pero esta vez utilizamos los genes del VP2 y VP6 juntos, comparándolo con otro grupo de ratones a los que se les inoculó el plásmido con el gen del VP6 solamente. Nuestra meta era probar que el plásmido con el gen del VP6+VP2 era mucho más efectiva que el plásmido con únicamente el gen del VP6. A los diferentes grupos de ratones se les infectó con el rotavirus después de haber sido vacunados y se recogieron sus heces las cuales fueron usadas para realizar el ensayo de ELISA, el cual funcionó para determinar la carga viral presente. Después de llevar a cabo los experimentos pasamos a la fase de obtención de resultados, los resultados nos mostraron que la vacuna más efectiva había sido la que contenía los plásmidos de VP6+VP2 ya que esta había sido la que mantuvo los niveles de rotavirus más bajos en comparación con la vacuna de solo VP6. Esto nos llevó a concluir que la vacuna más efectiva era la de VP6+VP2.

## **INTRODUCCIÓN**

### Generalidades

Rotavirus es el principal agente etiológico de diarreas severas y la causa más común de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años en todo el mundo, ya que provoca alrededor de 600,000 muertes al año (Penelope, 2008). El virus infecta a los enterocitos de la punta de las vellocidades del intestino delgado provocando fiebre, vómito y diarrea que de no ser bien atendidos pueden conducir a la muerte. De esta manera, la deshidratación y el desbalance de electrolitos son los principales síntomas de la infección.

Cada año, rotavirus causa aproximadamente 114 millones de episodios de gastroenteritis que solo requieren de cuidados menores, 24 millones de visitas a una clínica y 2.4 millones de casos de hospitalización en niños menores de 5 años (Penelope, 2008). A los 5 años de edad, casi todos los niños habrán sufrido un episodio de gastroenteritis causada por rotavirus, 1 de cada 5 habrá visitado una clínica, 1 de cada 50 habrá sido hospitalizado y aproximadamente 1 de cada 205 morirá (Glass, et al, 2006). Estudios recientes indican que rotavirus causa aproximadamente el 39 % de las hospitalizaciones por diarrea en niños alrededor del mundo (Parashar, et al, 2006).

### Estructura Viral

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*. Son virus de aproximadamente 70 nm de diámetro y tienen una geometría icosaédrica. El virus está compuesto de tres capas proteicas, una capa externa, una capa intermedia y una capa interna. Cada capa del virus tiene proteínas a las cuales se les denomina VP, “*viral protein*” por sus siglas en inglés. La capa externa, tiene las proteínas VP4 y VP7; la capa media, la VP6 y la capa interna de proteínas es la VP2.

La principal vía de transmisión del virus es la fecal-oral, no obstante, la infección por contacto directo con superficies contaminadas también ha sido propuesta. Durante la infección, grandes cantidades de partículas virales, son excretadas junto con las heces (Estes et al, 1979).

### Serotipos

El rotavirus, al igual que el virus de la influenza, muta constantemente. Por este motivo, se necesita aplicar vacunas anualmente para prevenir la enfermedad. Específicamente, un serotipo es el nombre que se le ha dado a la mutación del rotavirus; la estructura de las proteínas VP4 y VP7, las externas de éste, cambia, por lo que el cuerpo, aún siendo inmune al rotavirus normal podría infectarse. Hasta la fecha se han caracterizado 14 serotipos G ("G" por glicoproteína, en base a la proteína VP7), y en base a la proteína VP4, se han caracterizados 21 genotipos P ("P" por sensible a proteasas) de los cuales solo 10 serotipos G y 7 genotipos P se encuentran en los rotavirus que infectan al humano (Hoshino y Kapikian, 2000).

### Respuesta inmune de mucosas

A pesar de aproximadamente tres décadas de investigación, la respuesta inmune ante una infección por rotavirus aun no está totalmente comprendida. El modelo de ratón ha sido ampliamente utilizado para investigar la contribución de los diferentes componentes del sistema inmune que confieren protección (Ward, 2003). Estos estudios sugieren que tanto la respuesta humoral como la respuesta mediada por células T en el intestino delgado, son importantes en la resolución de la infección y en la protección ante una futura infección.

## **Antecedentes**

### Virus atenuado

Los intentos para generar una vacuna que prevenga la diarrea causada por rotavirus en infantes humanos se han basado en preparaciones de virus humanos atenuados o virus heterólogos (que normalmente infectan a otra especie) que infectan de manera atenuada al humano. De esta manera, en 1998 se aprobó en los Estados Unidos una vacuna oral tetravalente basada en el rotavirus de simio RRV, la cual consiste en una mezcla de cuatro virus que expresan cada uno de los cuatro serotipos G presentes en los rotavirus humanos de importancia clínica (Perez-Schael et al., 1997). Aunque los resultados obtenidos con esta vacuna resultaron alentadores (confiriendo aprox. 50 % de protección contra la diarrea severa), un año después de la administración la vacuna fue suspendida al encontrarse que algunos niños vacunados presentaban intususcepción intestinal, que es una forma de invaginación del intestino que puede conducir a la obstrucción parcial o total del intestino (Miller, 1999).

## Vacunas de DNA

Para generar una respuesta inmune se requiere que el individuo haya sido expuesto al virus de manera que produzca anticuerpos que reconozcan a las proteínas que conforman al virus y las precipiten. Una forma eficiente para producir estas proteínas y así lograr una buena respuesta inmunológica sería introduciendo un plásmido que contenga la secuencia que codifique para la proteína deseada en las células del individuo. Un plásmido es DNA circular que tiene como características contar con un origen de replicación y el gen que le proporcione alguna resistencia a antibiótico. Éste pasa a ser parte de la célula, se replica y sus genes se expresan para producir proteínas. Las ya mencionadas VP6 y VP2 podrían ser usadas para generar una respuesta inmunológica. Dado a que es mucho más probable que cambien las capas externas (VP4, VP7), ya que están expuestas a menor presión selectiva. Por esta razón cuando se trata de generar vacunas que puedan perdurar, en el caso particular del rotavirus, sería más efectivo usar como antígeno la que se encuentra en la capa media (VP6) y la de la capa interna (VP2).

## Prueba de ELISA

El ensayo de ELISA es una técnica que sirve para identificar la cantidad de anticuerpos o carga viral. El ensayo de ELISA puede ser de muchos tipos, ya que se pueden agregar diferentes sustancias y tiene diferentes usos ya que se realiza en medicina, biología, etc. El tipo de ensayo que nosotros realizamos es el que se ilustra esquemáticamente en la figura 1 y el procedimiento de la realización de este ensayo se encuentra en la estrategia experimental. Esta técnica se utiliza para determinar la cantidad de rotavirus que había en cada una de las heces de los ratones y así poder llegar a probar nuestra hipótesis.

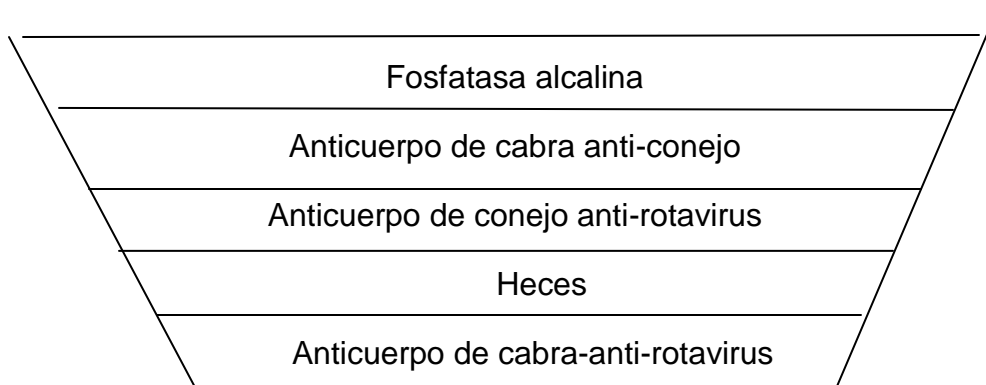


Figura 1. Dibujo esquemático de placa de prueba de ELISA

## **HIPOTESIS**

La co-inoculación intramuscular de los plásmidos que codifican para VP6 y para VP2 del rotavirus inducirá una respuesta inmune protectora más eficiente contra la infección, en comparación con la inoculación de solamente VP6.

## **OBJETIVO**

Evaluar si la co-inoculación intramuscular de plásmidos que codifican para VP2 y VP6 de rotavirus induce una respuesta inmune protectora más eficiente contra la infección y comparar los resultados con la inoculación del plásmido con solamente VP6.

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

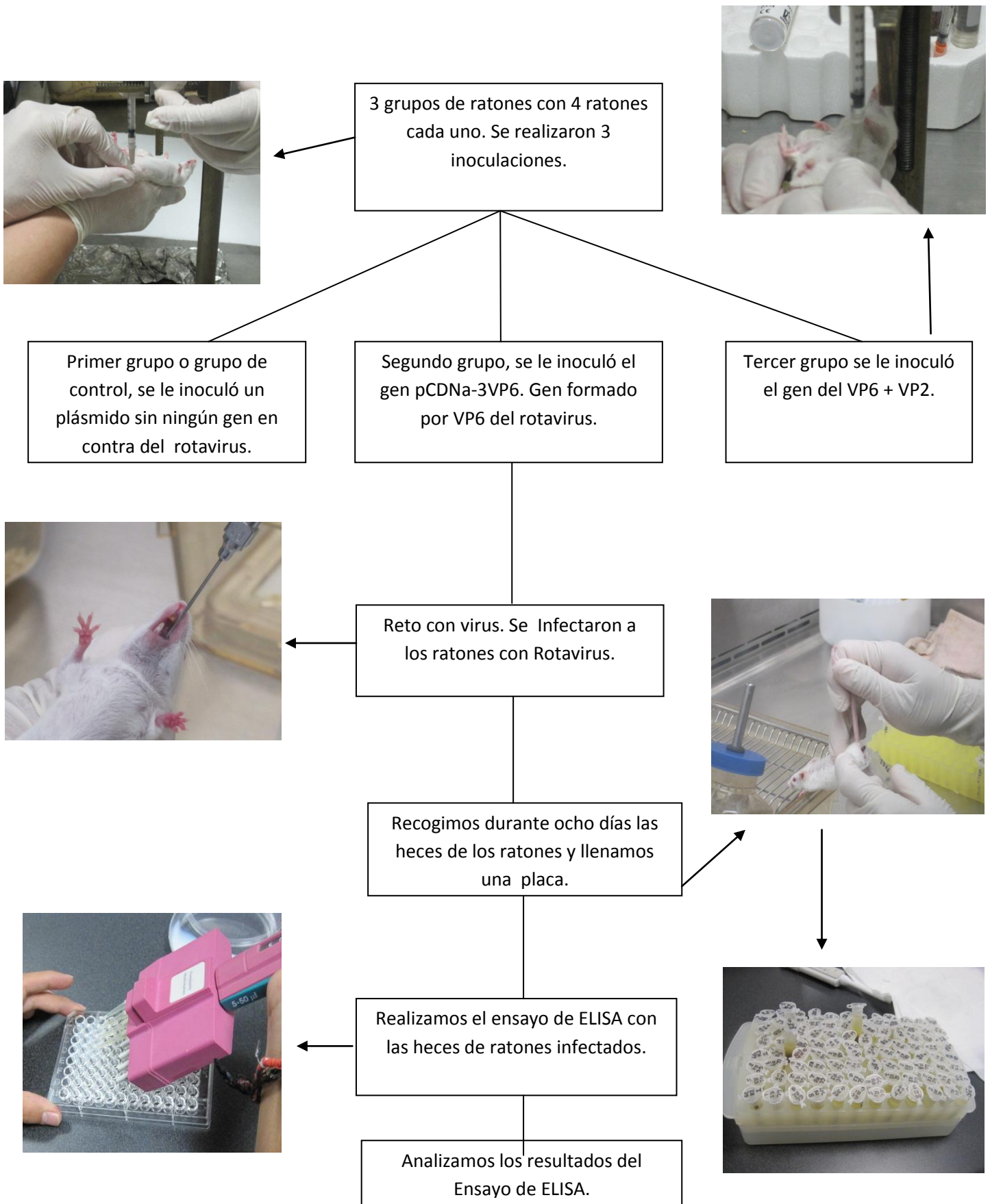


Figura 2. Estrategia experimental del proyecto

## METODOLOGÍA

### Inoculación de ratones:

Contamos con tres grupos de ratones de laboratorio. Había cuatro ratones en cada grupo. A cada uno de estos grupos se les inoculó diferentes tipos de plásmidos. Al primer grupo, nuestro control, se le inoculó con plásmidos que no contenían material genético del rotavirus. Al segundo grupo únicamente se le inoculó el plásmido pCDNA-3VP6 (éste fue proporcionado por nuestro asesor). Y el tercer los dos plásmidos que producimos con el gen del VP6 + VP2.

Después realizamos tres inoculaciones con intervalos de 15 días entre cada una. La manera de inocular fue la siguiente: primero se toma al ratón de la cola para someterlo a una postura que nos facilite la inoculación. Se toma una de sus piernas y se limpia con un poco de alcohol. Después, se le inyecta en el mismo lugar 100  $\mu$ l del antígeno correspondiente (foto 1). El mismo procedimiento se aplica a cada pata, por cada ratón.

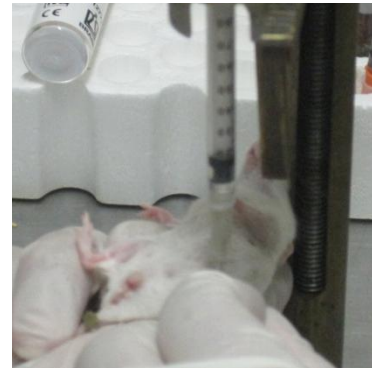


Foto 1

### Reto con virus:

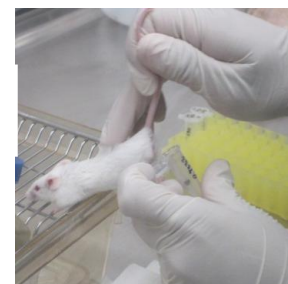
Al finalizar la tercera inoculación volvimos a esperar quince días para realizar el reto con virus a los ratones; esto es, infectar a los ratones con el rotavirus murino llamado EDIM. Este reto se realizó de manera oral a los tres grupos de ratones (Foto 2).



Foto 2.

Después de realizar la infección, se recolectaron las heces de cada uno de los ratones durante ocho días (Foto 3).

Foto 3.



### Prueba de ELISA:

Una vez que tuvimos recolectadas las heces durante los ocho días, procedimos a realizar el ensayo de ELISA para saber el nivel de protección contra el rotavirus. El ensayo de ELISA se realizó con tres diferentes placas, una placa para cada grupo de ratón (Foto 4). Estas placas tienen unos pocitos, los cuales permiten un fenómeno físico de adherencia que hace que cualquier molécula grande se quede impregnada en estos.



Foto 4.

Lo primero que agregamos en los pocitos del ensayo de ELISA fue CABRAX, el cual es un anticuerpo de cabra anti-rotavirus. Este se queda pegado en la parte de abajo del pocito. Después se realizó un baño de leche para rellenar los huecos que se forman entre las moléculas y al desechar la leche también se eliminan otras sustancias. Esto se dejó reposar toda la noche a 4°C.

Acto seguido, se agregaron las heces, las cuales contenían rotavirus. Entonces el anticuerpo de cabra anti-rotavirus las reconoció y las atrapó, pegándolas arriba de este. Y se volvió a realizar un baño de leche. Al acabar esto se agregó a los pocitos de la placa del ELISA un anticuerpo de conejo anti-rotavirus que reconoce a las heces y se pega a los virus. Y se realizó otro baño. La placa se dejó reposar una hora a 36°C.

Después se agregó el anticuerpo de cabra anti-conejo que reconoce al anticuerpo de conejo anti-rotavirus y se pega sobre de este. Y se realizó otro baño. Y la placa vuelve a reposar 1 hora a 36°C.

Por último se agrega la fosfatasa alcalina. Ésta es una enzima que contiene un sustrato el cual nos dio el color amarillo. Todo este procedimiento se ilustra en la Figura 1.

Una vez acabado todo este procedimiento, las placas se colocaron en el espectrofotómetro con el cual puedes medir la intensidad del amarillo y este es proporcional a la cantidad del rotavirus en el ratón.

## RESULTADOS

En la figura 3 mostramos los resultados de la prueba de ELISA con sus respectivas desviaciones estándar. La línea azul muestra el nivel de rotavirus presente en el grupo de ratones inoculados con el plásmido sin ningún gen contra el rotavirus. La línea roja muestra el nivel de rotavirus de los ratones inoculados con VP6 y la línea verde muestra el nivel de rotavirus presente en los ratones inoculados con VP6+VP2. El detalle de los de estos datos de incluye en el Anexo 2.

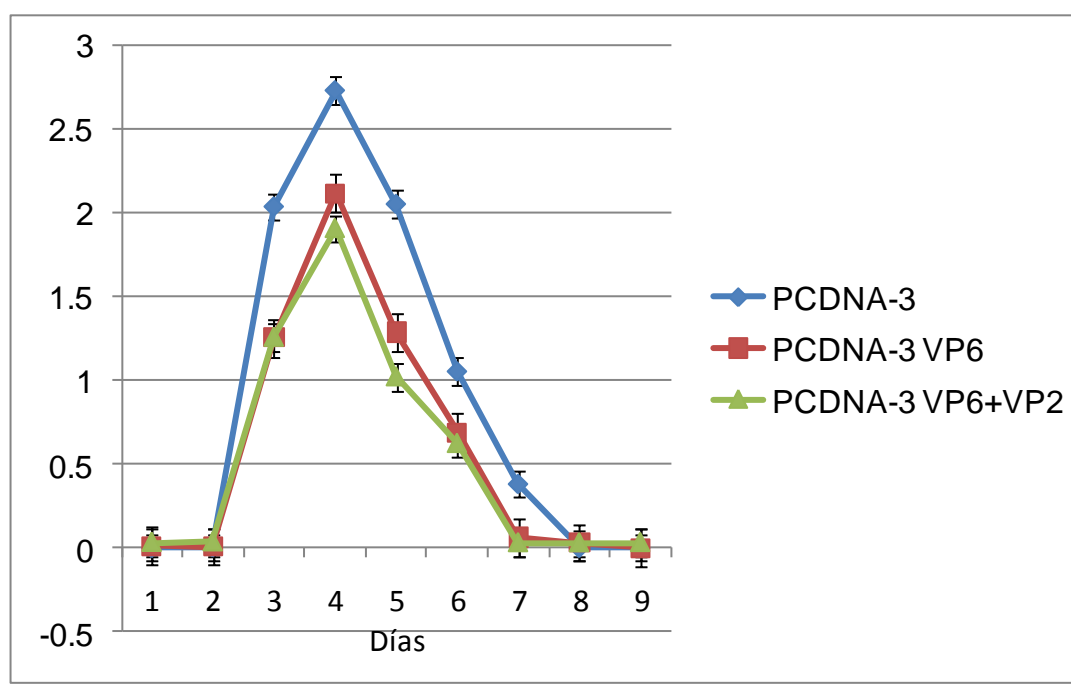


Figura 3. Resultados de la prueba de ELISA con desviación estándar.

Durante los días uno y dos las tres líneas se sobrelapan debido a que los virus son tan escasos que, inclusive sin vacuna, no logran alcanzar grandes cantidades. En los días consecuentes aumentó paulatinamente la cantidad de virus presente, pero se observó que el ratón que se encontraba mejor preparado para combatir al virus presente fue el que contaba con la vacuna de VP2+VP6. El momento más significativo es el día cuatro, en el cual se muestra en la figura 4.

La figura 4 muestra los resultados del día cuatro junto con sus desviaciones estándar. Gracias a esto podemos apreciar de una forma más clara la diferencia entre estos resultados.

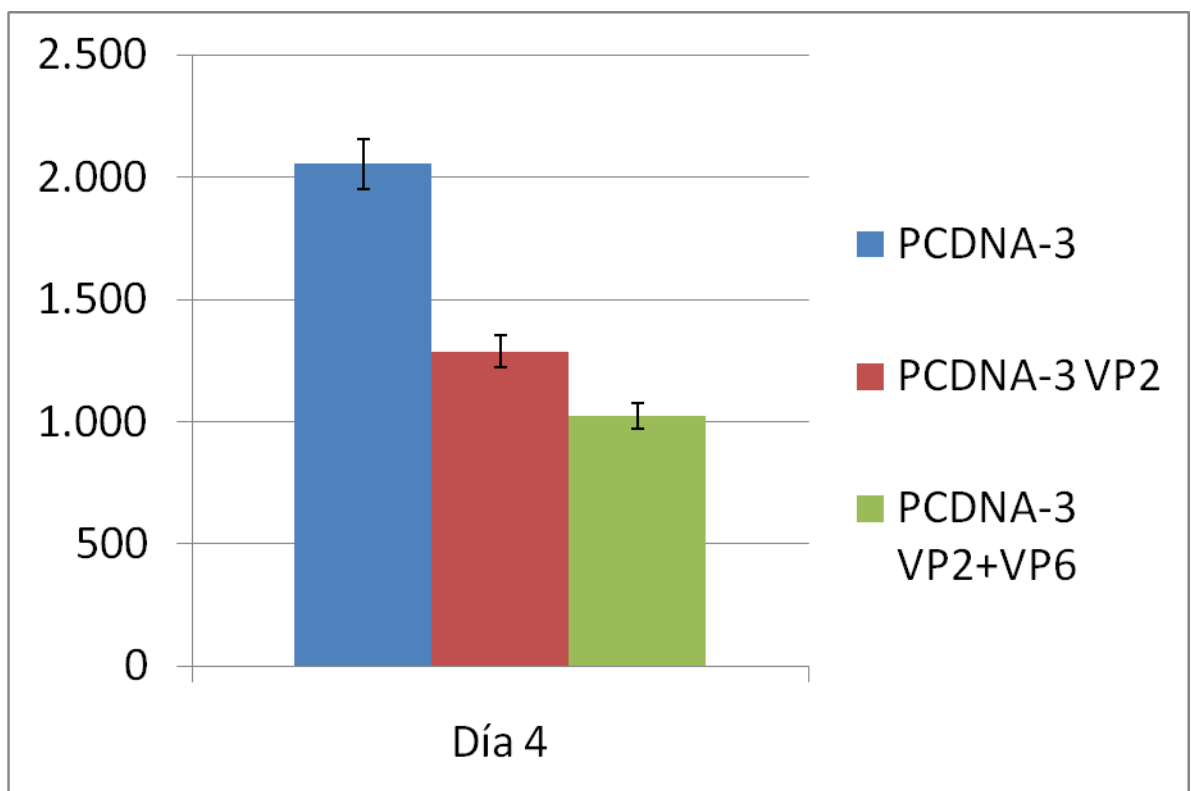


Figura 4. Resultados de la prueba de ELISA del día cuatro, junto con sus respectivas desviaciones estándar.

Gracias al análisis de la gráfica mostrada en la figura 4 pudimos observar que los niveles de rotavirus presentes en el grupo de ratones inoculados con el plásmido que no contenía ningún gen contra el rotavirus, fueron considerablemente más elevados en comparación con los ratones que habían recibido una vacuna, la cual contenía plásmidos con gen contra el rotavirus. Los resultados más satisfactorios entre los grupos que habían recibido las diferentes vacunas en comparación con el grupo testigo fueron los de la vacuna que contenía los plásmidos de VP2+VP6, la cual mantuvo los niveles de rotavirus presentes en los ratones correspondientes a este grupo en los niveles más bajos.

## **CONCLUSIÓN**

La vacuna de VP6+VP2 fue la que arrojó los resultados más satisfactorios en comparación con el otro grupo vacunado. Estos resultados indican que la vacuna que contenía VP6+VP2 logró obtener los niveles más bajo de rotavirus en los ratones.

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer Fernando Esquivel por asesorarnos en este proyecto y darnos la oportunidad de trabajar en su laboratorio, a Guillermo Fernández por siempre resolvernos nuestras dudas y también al Profesor Galindo por su apoyo y sus críticas constructivas.

## **BIBLIOGRAFIA**

Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C.P., and Smith, E.M. 1979. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *J. Virology*, 31:810-805.

Glass, R. I., J. Bresee, B. Jiang, U. Parashar, E. Yee, and J. Gentsch. 2006. Rotavirus and rotavirus vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 582: 45–54.

Hoshino Y. y Kapikian, A. Z. Rotavirus serotypes: clasification and importance in epidemiology, immunity and vaccine development. *J Health Popul Nutr.* 2000; 18:5-14.

Miller, J.L. 1999. CDC says upcoming doses of rotavirus vaccine should be delayed. *Am.J. Health Syst. Pharm*, 56-1589.

Parashar, U. D., Gibson, J. S. Bresse, C.J. and, Glass, R.I. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 304–306.

Penelope H. Dennehy, 2008 Rotavirus Vaccines: an Overview. *Microbiology.* 21:198–208.

Pérez-Schael, I., Maria J. Gruñitas, M.J., Pérez, M., Vito Pagone, V., Rojas, A.M., González, R., Cunto, W., Hoshino, Y., y Kapikian, A.Z. 1997, Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in Infants and young children in Venezuela. *The New England Journal of Medicine*, 337: 1181-1187.

Ward, R. L. 2003. Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccines as determined with the adult mouse model. *Viral Immunol.* 16:17–24.

## Anexo 1

### Protocolo experimental detallado proporcionado por Fernando Esquivel

#### **1) Obtención y purificación de plásmidos.**

Los plásmidos pCDNA-3, pCDNA-3VP6 y pCDNA-3VP2 serán purificados a partir de cultivos de *E. coli* DH5- $\alpha$  transformadas usando el sistema de purificación de ADN "Endofree" de la compañía (QuiaGen). Las purificaciones obtenidas con este sistema están libres de endotoxinas. La purificación se llevara a cabo de la siguiente manera:

Las bacterias transformadas se crecerán en 10ml de medio LB con ampicilina (50  $\mu$ g/ml) por 8 horas a 37°C con agitación. Al término de la incubación se inoculara 1ml de cultivo, en un litro de medio LB con ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se incubara toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaran a 8000 rpm a 4°C por 15min y la pastilla bacteriana se resuspenderá por medio de pipeteo en 50ml de amortiguador P1 frío (50mM Tris-C1 pH 8.0, 10 mM EDTA), y se adicionara 50ml del amortiguador P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), previamente calentado, mezclar invirtiendo de 4 a 6 veces e incubar 5min a temperatura ambiente.

En seguida se adicionaran 50 ml de buffer P3 frío (3.0 M Kac pH 5.5), mezclándolo suavemente de 4 a 6 veces. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente filtrar el lisado por gravedad a través de una membrana incluida en el sistema de purificación. Adicionar al filtrado 2.5 ml de Buffer ER y mezclar invirtiendo 10 veces el tubo. Incubar en hielo por 30 minutos. Pasar el filtrado por una columna (que contiene una resina que esta basada en la interacción entre los fosfatos cargados negativamente del DNA y la carga positiva de los grupos DEAE que se encuentran en la superficie de la resina) que previamente será equilibrada con 30 ml de Buffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100), en el cual se adhiere el DNA plasmidico. Se lava la columna con 600 ml de Buffer QC (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol). Eluir el plásmido de la columna utilizando 35 ml de buffer QN (1.6M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol). Se precipito el plásmido con 25 ml de isopropanol. Centrifugar a 11000 rpm por 30 minutos a 4° centígrados y desechar el sobrenadante.

Finalmente la pastilla se lavo con 7 ml de alcohol al 70%. Centrifugar a 11000 rpm por 10 minutos a 4° centígrados, desechar el sobrenadante y dejar secar la pastilla

de 10 a 20 minutos para después disolverla en 250 µl de agua de ampolleta libre de endotoxinas.

## **2) Inoculación de plásmidos en ratones BABL/c**

Se realizarán 3 series de inoculaciones. La inoculación de los ratones, se realizará cada 15 días. Se organizarán 3 grupos de ratones, a fin de conseguir el siguiente arreglo:

- a) Se inocularán 4 ratones con 100µg de plásmido PCDNA-3 en el cuádriceps de cada pata trasera. Este grupo de ratones, nos servirán como control negativo, ya que el plásmido inoculado, no contiene DNA que codifique para las proteínas virales que se están evaluando.
- b) Se inocularán 4 ratones con 100µg de plásmido PCDNA-3 VP6 en cada pata. Este grupo nos servirá para evaluar la proteína VP6 como sistema de vacunación ya que, se ha reportado que VP6 producida *in vivo* como vacuna de DNA es capaz de inducir respuestas protectoras parciales.
- c) Se co-inocularán 4 ratones con 100µg de plásmido PCDNA-3 VP6 más 10 µg a 100 µg de PCDNA-3 VP2 en los cuádriceps de cada pata. De este grupo, esperamos una protección mayor, ya que el plásmido que codifica para VP2 inoculado intramuscularmente en ratones no induce protección contra la infección, sin embargo aumenta la capacidad protectora de VP6 cuando ambos plásmidos son co-inoculados (Arias, 2003).<sup>1</sup>

## **3) Ensayo de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos antirotavirus**

Los ratones serán sangrados por la cola, 15 días después de cada inoculación. Las muestras serán tomadas en tubos que contienen heparina (anticoagulante). Una vez tomadas las muestras, se centrifugan 5 minutos a

---

<sup>1</sup> Arias, N. Tesis de Licenciatura: Inmunización con ADN para la obtención de respuestas inmunes contra antígenos individuales de rotavirus. Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM. Cuernavaca Morelos, México, 2003

2000 rpm. De esta manera, recuperamos plasma sanguíneo donde se encuentran los anticuerpos de interés.

El ensayo de ELISA se realizara de la siguiente manera:

- a) Cargar la placa de ELISA (High Binding) con 200 ng de DLP's (Double Layer Particle) en 50  $\mu$ l de PBS por pozo y 0.02% de AzNa (Azida de Sodio) y se incubara la placa toda la noche a 4° centígrados.
- b) Lavar la placa 2 veces con 150  $\mu$ l de solución de lavado (PBS + 0.05% Tween 20).
- c) Bloquear la placa por 2 horas a temperatura ambiente, utilizando 150  $\mu$ l de solución bloqueadora ( PBS 5% leche + 0.02% de AzNa).
- d) Lavar la placa 2 veces con 150  $\mu$ l de solución de lavado (PBS + 0.05% Tween 20).
- e) Adicionar por duplicado 50  $\mu$ l del plasma diluido 1/200 en solución bloqueadora. Incubar 2 horas a 37° centígrados. No utilizar AzNa en este paso.
- f) Lavar la placa 4 veces con 150  $\mu$ l de solución de lavado (PBS + 0.05% Tween 20).
- g) Adicionar 50  $\mu$ l por pozo del anticuerpo anti IgG's de ratón acoplado a peroxidada en una dilución 1:2500 en solución PBS 5% leche. Incubar 1 hora a 37° centígrados.
- h) Lavar la placa 4 veces con 150  $\mu$ l de solución de lavado (PBS + 0.05% Tween 20).
- i) Adicionar 50  $\mu$ l del sustrato en solución Fosfato-Citrato e incubar de 10 a 20 minutos a temperatura ambiente.  
5 ml de Fosfato Citrato  
  
2 mg de Ortofenilen-diamina  
  
10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- j) Bloquear la reacción con 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M
- k) Leer la placa de ELISA a 492 nm.

#### **4) Reto de los ratones inmunizados con el rotavirus murino EDIM**

Los ratones serán retados oralmente con  $1 \times 10^5$  uff de rotavirus murino EDIM, de la siguiente manera.

- a) Hacer una preparación de 1500  $\mu$ l de medio MEM<sup>r</sup> sin suero con 15  $\mu$ l del rotavirus EDIM.
- b) Tomar 1500  $\mu$ l de Bicarbonato de Sodio al 1.33%

- c) Administrar vía oral 100 µl de Bicarbonato de Sodio a cada ratón.
- d) 5 minutos después de administrar el Bicarbonato de Sodio, administrar vía oral 100 µl de la preparación MEM/EDIM.

## 5) Determinación de carga viral en heces a través de un ensayo de ELISA

A partir del día del reto con EDIM, se colectaran heces de los ratones infectados durante 8 días. La recolección debe efectuarse cada 24 horas.

Una vez colectadas todas las muestras, se debe agregar buffer diluyente y guardar a 4° grados toda la noche. Al día siguiente, se disgregan las heces y se realiza un ensayo de ELISA de captura para determinar la carga viral de la siguiente manera:

- a) Cargar la placa de ELISA (High Binding) con 50 µl de un anticuerpo cabra anti-rotavirus en PBS 1:2500 + 0.02% de AzNa. Guardar a 4° centígrados toda la noche.
- b) Lavar la placa 2 veces con 150 µl de solución de lavado (TNC).
- c) Bloquear la placa por 2 horas a temperatura ambiente, utilizando 150 µl de solución bloqueadora (TNC 5% leche).
- d) Lavar la placa 2 veces con 150 µl de solución de lavado.
- e) Centrifugar muestras de heces por 5 min. a 14,000 rpm. Cargar la placa con 50 µl de las muestras de heces por duplicado. Incubar 2 horas a 37°C
- f) Lavar la placa 4 veces con 150 µl de solución de lavado.
- g) Agregar 50 µl del anticuerpo de conejo anti TLP's de rotavirus 1:2500 en una solución TNC 5% leche. Incubar 1 hora a 37°.
- h) Lavar la placa 4 veces con 150 µl de solución de lavado.
- i) Agregar 50 µl del anticuerpo Cabra anti conejo acoplado a fosfatasa alcalina 1:1500 en TNC 5% leche. Incubar 1 hora a 37° centígrados.
- j) Lavar la placa 4 veces con 150 µl de solución de lavado.
- k) Agregar 50 µl del sustrato PNPP 1/100 en Dietanolamina 0.1%. Incubar de 30 a 60 minutos a 37 ° centígrados. Leer la placa cada 15 minutos hasta que el control positivo de una lectura de 3.00 en la absorbancia.
- l) Leer la placa a 405 nm.

Para determinar protección, se analizan los datos de la lectura de ELISA y se grafica en el eje Y la absorbancia y en el eje X los días transcurridos.

## Anexo 2

### Resultados del ensayo de ELISA.

#### PCDNA-3

		Día	0	1	2	3	4	5
Absorbancia	R2		0,015	0,019	1,565	2,859	2,354	0
	R2		-0,013	-0,012	1,578	2,79	2,114	0
	R3		-0,009	-0,01	2,242	2,715	1,811	1,173
	R3		0,004	0,013	2,194	2,691	1,883	1,169
	R4		-0,011	-0,002	2,315	2,685	2,08	1,952
	R4		0,016	0,007	2,346	2,661	2,088	2,035
	<b>Promedio</b>		<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>2,040</b>	<b>2,734</b>	<b>2,055</b>	<b>1,055</b>
	<b>Desv. Estandar</b>		<b>0,01317067</b>	<b>0,01256583</b>	<b>0,36683784</b>	<b>0,07576213</b>	<b>0,19168516</b>	<b>0,89643503</b>

#### PCDNA-3 VP6

		Día	0	1	2	3	4	5
Absorbancia	R1		0,016	0,011	1,915	2,688	1,436	0,005
	R1		-0,016	-0,009	1,749	2,537	1,438	-0,008
	R2		-0,016	-0,017	0,573	1,846	1,365	1,008
	R2		-0,017	-0,015	0,588	1,792	1,353	1,041
	R3		-0,015	-0,013	1,527	1,909	0,545	0,023
	R3		-0,01	-0,019	1,553	1,898	0,578	0,012
	R4		-0,019	-0,012	1,063	2,112	1,736	1,689
	R4		-0,016	0,01	1,084	2,174	1,852	1,759
<b>Promedio</b>		<b>-0,012</b>	<b>-0,008</b>	<b>1,257</b>	<b>2,120</b>	<b>1,288</b>	<b>0,691</b>	
<b>Desv. Estandar</b>		<b>0,01145098</b>	<b>0,01182008</b>	<b>0,50969515</b>	<b>0,33294272</b>	<b>0,48247974</b>	<b>0,77699778</b>	

#### PCDNA-3 VP6+VP2

		Día	0	1	2	3	4	5
Absorbancia	R1		0,005	0,029	0,063	1,739	0,805	0,112
	R1		0,044	0,015	0,022	1,548	0,725	0,087
	R2		0,042	0,035	1,637	2,128	1,183	2,99
	R2		0,041	0,015	1,444	2,036	1,173	0,332
	R3		0,018	0,035	1,389	1,728	0,587	0,068
	R3		0,029	0,035	1,512	1,778	0,592	0,084
	R4		0,03	0,054	1,922	2,133	1,48	0,634
	R4		0,048	0,063	2,093	2,199	1,639	0,688
<b>Promedio</b>		<b>0,032</b>	<b>0,035</b>	<b>1,260</b>	<b>1,911</b>	<b>1,023</b>	<b>0,624</b>	
<b>Desv. Estandar</b>		<b>0,01473031</b>	<b>0,01682207</b>	<b>0,788644</b>	<b>0,24126834</b>	<b>0,40507319</b>	<b>0,98840881</b>	

6	7	8
0,43	0,014	0,001
0,388	-0,009	-0,008
0,2	-0,008	-0,005
0,185	-0,001	0,005
0,56	-0,017	0,008
0,527	0,009	0,02
<b>0,382</b>	<b>-0,002</b>	<b>0,004</b>
<b>0,15936206</b>	<b>0,0117303</b>	<b>0,01005485</b>

6	7	8
-0,003	0	0,002
-0,022	-0,021	-0,018
0,112	-0,012	-0,005
0,147	-0,01	-0,017
0,015	-0,016	-0,002
-0,007	-0,023	-0,022
0,133	0,135	-0,02
0,132	0,193	-0,011
<b>0,063</b>	<b>0,031</b>	<b>-0,012</b>
<b>0,07358365</b>	<b>0,08398937</b>	<b>0,00902279</b>

6	7	8
0,033	0,045	0,036
0,012	-0,011	-0,024
0,041	0,031	0,048
0,039	0,038	0,03
0,025	0,027	0,039
0,019	0,043	0,019
0,033	0,03	0,046
0,041	0,038	0,057
<b>0,030</b>	<b>0,030</b>	<b>0,031</b>
<b>0,01075623</b>	<b>0,0177799</b>	<b>0,02520735</b>