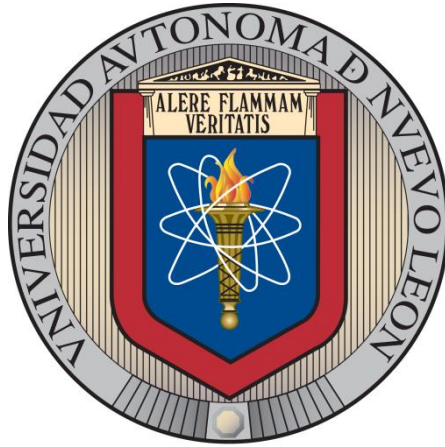


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE CEPAS DEL VIRUS INFLUENZA EN  
AVES MIGRATORIAS Y RESIDENTES DEL NORTE DE MÉXICO”**

**POR**

**Q.B.P. CÉSAR IVÁN ROMO SÁENZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN**

**ENERO 2014**

**VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE CEPAS DEL VIRUS INFLUENZA EN AVES  
MIGRATORIAS Y RESIDENTES DEL NORTE DE MÉXICO**

**COMITÉ DE TESIS**

*Contral.*

---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

DIRECTOR DE TESIS

*Lydia Guadalupe Rivera Morales*

---

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

SECRETARIO

*Carlos Eduardo Hernández Luna*

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

VOCAL

*Licet Villareal Treviño*

---

Dra. Licet Villareal Treviño

VOCAL

*José Ignacio González Rojas*

---

Dr. José Ignacio González Rojas

VOCAL

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, con el apoyo del proyecto PAICYT No CN439-10. y CONACYT No. 126725.

*Lo que importa verdaderamente en la vida no son los  
objetivos que nos marcamos, sino los caminos que  
seguimos para lograrlos "*

*(Percy B Shelley)*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis el **Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**, por permitirme participar en este proyecto y continuar en mi camino como investigador, gracias por enseñarme que cada día podemos aprender algo nuevo, gracias por la paciencia, los consejos, el apoyo, pero sobre todo por ayudarme a entender la diferencia entre **HACER ALGO** y **SABER HACER ALGO**.

A mis asesores gracias por el apoyo brindado durante este tiempo que duro el proyecto, sus enseñanzas y opiniones **DR. CARLOS EDUARDO HERNANDEZ LUNA, DR. JOSE IGNACIO GONZALEZ ROJAS, DRA. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES, DRA. LICET VILLARREAL TREVIÑO**.

Le agradezco a la **Dra. MARÍA CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA**, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el departamento de Virología e inmunología de la facultad de ciencias biológicas de la UANL.

Gracias al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA** por el apoyo brindado, ya que fue parte importante en mi vida durante estos dos años.

A mis amigos **NORA, CLAUDITA, DALILA, MARCELA, ALDO, AIDA, OMAR, DIEGO, MARIEL, MARIELSE, PACO, CHARLIE, YAREELLYS, GABY, JULIAN, CLAUDIA MURGA, NORA FLORES, MARIANA, ADRIANA y DANIEL** jamás olvidare todas esas platicas de enriquecimiento, desahogo, criticas, etc... los **ESTIMO MUCHO**, espero algún día poder colaborar con ustedes.

Gracias también a mis compañeros de laboratorio, por enseñarme a tener más paciencia y comprender que las cosas son muy diferentes en cada lugar, gracias **MC. NORA NARANJOS, QBP. CLAUDIA PLATA, QBP ERIKA CAZARES, QBP DINORA AMEZCUA, QBP VERONICA LOAIZA**.

**DRA. GRISELDA EDITH MENCHACA RAMIREZ** gracias por todo el apoyo técnico que me proporciono durante estos dos años. Siempre la admirare por lo buen profesionista que es.

Al Laboratorio de Biología de la conservación gracias por el apoyo con la colección de las muestras e identificación de las aves, a la Dra. Irene Rubalcaba, M.V.Z. Claudia Cerda, pero en especial a **HÉCTOR GARCÍA E ISAAC T. CASTAÑEDA** porque parte del trabajo más difícil lo hicieron ustedes al estar en campo y todo lo que esto implica.

A la **SECRETARIA DE POSGRADO DE LA FCB DE LA UANL**, en especial a **MIRTHALA** gracias por todo el **APOYO** brindado durante estos dos años.

## **DEDICATORIA**

A mis abuelos: **CARMEN GARCÍA CHÁVEZ** y **FRANCISCO ROMO ANGUIANO**, por su experiencia, trabajo, disciplina, esfuerzo y sabiduría siempre han sido una inspiración.

A mis hermanos **ALEX, ERICK Y DAVID** gracias por estar ahí siempre, actualmente cada uno tomo caminos diferentes, sin embargo esos caminos siempre nos llevaran al mismo lugar, el cual es estar juntos.

A mis padres por darme la vida, una excelente formación, por su ternura, su dureza y todo su amor, pero sobre todo por heredarme las ganas de triunfar y nunca rendirse. **PAPÁ** usted me enseñó que para obtener grandes cosas, en ocasiones tenemos que sacrificarnos un poco y donde quiera que esté, tengo que decirle que lo siempre será un ejemplo en mi vida. **MAMÁ**, usted me puso como ejemplo el luchar cada día y ser decidido, el pelear contra la adversidad, que existen condiciones dolorosas pero pasajeras, me enseñó a levantarme después de cada tropiezo, a ser perseverante y paciente, a dar pasos fijos para alcanzar mis metas, a ver los problemas con la cabeza fría y que todo tiene solución.

**Con todo mi amor y mi cariño.**

***“La mejor manera de demostrarse a la vida lo bien que la  
pasamos es con una sonrisa”***

## TABLA DE CONTENIDOS

SECCION	PÁGINA
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>VI</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Genoma.....	3
2.3 Taxonomía.....	4
2.4 Estructura viral.....	4
2.5 Composición del virus.....	6
2.6 Proteínas virales y patogénesis.....	6
2.6.1 Hemaglutinina.....	6
2.6.2 Proteína PB2, PB1 y PA.....	7
2.6.3 Proteína PB1-F2.....	7
2.6.4 Proteína de matriz M2 o Canal iónico.....	8
2.6.5 NS1.....	8
2.6.6 Neuraminidasa.....	9
2.7 Variabilidad antigénica.....	9
2.7.1 Shift antigénico.....	9

2.7.2 Shift antigénico .....	10
2.8 Tropicismo Viral.....	11
2.9 Ecología del virus influenza.....	12
2.10 Generalidades del gen 7 del virus influenza tipo A .....	13
2.11 Importancia biológica de la proteína M1 .....	14
2.11.1 Síntesis de la proteína M1 .....	14
2.11.2 Regulación de la transcripción del genoma viral.....	15
2.11.3 Interacción de M1 con caspasas.....	15
2.11.4 Interacción con histonas.....	15
2.11.5 Interacción con el complejo vRNP .....	16
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares .....	18
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>19</b>
5.1 Muestras de Heces y Sueros .....	19
5.2 Extracción de ARN viral.....	19
5.3 Método de Trizol: .....	19
5.5 Amplificación de la fracción del gen 7 del virus Influenza para su tipificación. 20	
5.6 Clonación del gen de matriz. ....	21
5.7 Ligación del producto de PCR al plásmido pGEM-T.....	22
5.8 Transformación de E.coli DH5 $\alpha$ competentes.....	22
5.9 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas. ....	22
5.10 Análisis de plásmidos purificados. ....	23
5.11 Secuenciación del fragmente del gen de matriz.....	24
5.12 Análisis de secuencia de ADN.....	25



5.13 Amplificación de la región codificante del gen 7 del virus Influenza. ....	25
5.14 Ligación del producto de PCR al plásmido pGEM-T .....	27
5.15 Transformación de E.coli DH5 $\alpha$ competentes. ....	27
5.16 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas .....	27
5.17 Análisis de plásmidos purificados .....	28
5.18 Secuenciación del gen de matriz.....	29
5.19 Análisis de secuencia de ADN.....	30
5.20 Subclonación.....	30
5.20.1 Preparación del inserto y plásmido de expresión.....	30
5.21 Ligación del producto de PCR y plásmido pET-28a (+) .....	31
5.22 Transformación de E.coli BL 21 competentes.....	31
5.23 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes.....	31
5.24 Lisis bacteriana .....	32
5.25 Análisis de Proteínas recombinantes .....	33
5.25.1 Purificación de proteínas recombinantes .....	33
5.26 Esquema de inmunización de los conejos y cabras con las proteínas recombinantes de la proteína de matriz M1 del virus influenza .....	34
5.28 Ensayo de ELISA indirecto para la titulación de los sueros anti M1 recombinante producidos en cabra y conejo.....	35
5.29 Western-blot.....	36
5.30 Ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza tipo A en humanos .....	36
5.31 Ensayo de ELISA tipo HADAS para la detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza tipo A.....	37
5.32 Ensayo de ELISA tipo HADAS para la detección de variantes antigénicas en la proteína M1 .....	38
5.33 Análisis estadísticos de los resultados: .....	38
5.33.1 Grafico de tipo ROC para el ensayo de Elisa tipo HADAS para la detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza tipo A.....	38
5.33. 2 Análisis de diferencias entre el control positivo con los dos antígenos..	39

<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
6.1 Distribución ecológica de especies en población colectada: .....	40
6.1.1 Muestras de heces .....	40
6.2 Detección molecular del virus influenza tipo A en aves migratorias y residentes de México.....	44
6.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 244 pb del gen 7 del virus influenza tipo A en aves silvestres.....	45
6.4 Detección de anticuerpos contra el virus influenza en aves silvestres.....	48
6.5 Secuenciación de la región completa de la proteína M1 del virus influenza de aves migratorias y residentes de México .....	49
6.6 Análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de matriz M1 del virus influenza. ....	50
6.7 Análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 .....	51
6.8 Expresión y purificación de la proteína M1 del virus influenza.....	59
6.9 Ensayos de Elisa: .....	60
6.9.1 Determinación del título de anticuerpos de trabajo para la detección de séricos en las muestras de aves. ....	60
6.9.2 Evaluación del suero control positivo control el virus influenza tipo A humano.....	61
6.9.3 Detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza utilizando la proteína recombinante M1 de la cepa Y10. ....	62
<b>7. DISCUSION.....</b>	<b>68</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>9. REFERENCIAS CITADAS.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Distribución ecológica de las diferentes especies con muestras de heces colectadas.....	42
II	Datos generales de las cepas seleccionadas para la secuenciación de la región codificante de M1.....	47
III	Porcentaje de identidad de las cepas secuenciadas con las de la base de datos .....	50
IV	Diferencias entre las secuencias de aminoácidos entre las cepas aisladas de campo.....	53
V	Promedios de las absorbancias de la titulación de los sueros anti M1 de la cepa Y10.....	60
VI	Reactividad de sueros humanos.....	61
VII	Reactividad de sueros de aves contra el antígeno rM1 de la muestra Y10.....	64
VIII	Anova de diferencia de medias.....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura externa del virus influenza tipo A.....	7
2	Estructura interna del virus influenza tipo A.....	7
3	Esquema de temperaturas para la tipificación del virus influenza tipo A .....	21
4	Esquema de temperaturas para la amplificación de 766 pb del gen 7.....	26
5	Diagrama de preparación de la cámara de electroforesis.....	34
6	Distribución de individuos por orden de muestras de heces colectadas durante el 2010-2012 en 4 estados de México.....	41
7	Distribución de individuos por familias de muestras de heces colectadas durante el 2010-2012 en 4 estados de México .....	41
8	Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de productos de PCR de la región de 244 pb del gen 7.....	43
9	Electroforesis en gel de agarosa 1 % de plásmido pGEM-T con insertos de 244 pb.....	43
10	Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de PCR de confirmación a partir plásmido pGEM-T con insertos de 244pb.....	44
11	Cromatograma de la secuencia de 264 pb en el plásmido pGEMT-T/M1 de la cepa aviar Bm21.....	45
12	Grafico de identidad de la región de 244 pb con la base de datos del NCBI.....	46
13	Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de productos de RTPCR purificados para la producción de M1 recombinante del virus influenza tipo A en aves.....	48
14	Electroforesis en gel de agarosa 1 % de plásmido pGEM-T con insertos de 766 pb.....	48
15	Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de productos de PCR de confirmación de la presencia de inserto de 766 pb del gen 7 del virus influenza tipo A en aves.....	49

16	Cromatograma de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEMT-T/M1.....	51
17	Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos deducida de la región codificante de la proteína M1 .....	52
18	Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la región M1 en aves residentes y migratorias de México.....	53
19	Análisis comparativo de las secuencias del gen 7 del virus influenza.....	54
20	Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la región M1 en aves residentes y migratorias de América.....	56
21	Análisis de predicción de epítopes lineales de cepas de alta patogenicidad, con respecto a las secuencias de la cepa Y8 y Y10.....	57
22	SDS-PAGE de proteína M1 recombinante.....	58
23	Análisis de wester blot.....	59
24	Esquema general del método de Elisa.....	62
25	Formato de sensibilización de placas.....	62
26	Sensibilización de placas con sueros de aves.....	63
27	Gráfico de tipo ROC del ensayo de Elisa.....	65
28	Gráfico de error.....	66

## NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-ácido sulfónico)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
BL21(DE3)	Nombre de cepa de <i>E. coli</i> utilizada para producir péptidos recombinantes
DH5 $\alpha$	Nombre de cepa de <i>E. coli</i> utilizada en protocolos de clonación
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
°C	Grados centígrados
HRP	Peroxidasa de rábano
Hrs	Horas
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosido
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertoni
M	Mol

mA	Miliamperios
mg	Miligramos
mM	Milimoles
$\mu$ M	Micromoles
min	Minutos
ml	Mililitros
$\mu$ l	Microlitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBS A	Buffer salino de fosfatos sin calcio ni magnesio
pH	Potencial de hidrógeno ( $-\log [H^+]$ )
%	Por ciento
rpm	Revoluciones por minute
seg	Segundos
SFB	Suero fetal de bovino

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SOC	Medio enriquecido para bacterias calcio competentes
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
U	Concentración de unidades enzimáticas
1X	Concentración de trabajo de una solución preparada a partir de un stock 10 o 50 veces concentrado (10X, 50X)



## RESUMEN

El virus influenza tipo A pertenece a familia Orthomyxoviridae. En base a las proteínas M y NP, se clasifican en tres tipos (A, B, C). Estudios de epidemiología molecular han revelado la alta prevalencia del virus influenza en las poblaciones aviares silvestres. M1 es una proteína que presenta epítopes específicos de grupo. Por tal motivo, es importante determinar si cambios en la secuencia de aminoácidos en esta proteína alteran sus características antigénicas y por consecuencia tienen potencial para escapar a su detección. **Objetivo:** Determinar la variabilidad antigénica del virus influenza tipo A circulante en aves migratorias y residentes de México. **Metodología:** Se colectaron muestras de suero y heces durante el 2009-2012. El RNA fue extraído empleando el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QUIAGEN). Para la identificación del virus, el RNA fue sometido a una RT-PCR OneStep de la región codificante de M1 del segmento 7. El producto de esta amplificación fue clonado, secuenciado y analizado filogenéticamente. Posteriormente se realizó una subclonación para la producción de proteínas recombinantes y obtención de anticuerpos policlonales. **Resultados.** Se analizaron por RTPCR 312 muestras de las cuales en 87 (26.9%) fue posible amplificar un producto de 766 pb específicos del gen 7 del virus influenza. Por su parte de 713 sueros analizados 210 (29.4%) mostraron reactividad con la proteína rM1 obtenida de la muestra Y10. No obstante, únicamente 7 (4.3%) mostraron reactividad cuando se utilizó como antígeno la proteína rM1 de la muestra Y8, la cual presenta una identidad del 98% con rM1 de Y10. **Conclusión.** Estos resultados muestran que diferencias de hasta 4 aminoácidos podrían llegar a generar variaciones antigénicas entre cepas del virus influenza tipo A.

## ABSTRACT

The influenza A virus belongs to the Orthomyxoviridae family. Based on the M and NP proteins are classified into three types (A, B, C). Molecular epidemiology studies have revealed the high prevalence of influenza viruses in wild bird populations. M1 is a protein that has specific group epitopes. Therefore, it is important to determine whether changes in the amino acid sequence of this protein alter its antigenic characteristics and therefore have the potential to escape its detection. **Objective:** Determine the antigenic variability of influenza virus circulating in migratory and resident birds of Mexico. **Methods:** Serum and feces were collected during 2009-2012. The RNA was extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Quiagen) commercial kit. To identify the virus, the RNA was subjected to a OneStep RT-PCR of the coding region of M1 segment 7. The product of this amplification was cloned, sequenced and analyzed phylogenetically. Subsequently subcloning for the production of recombinant proteins and production of polyclonal antibodies was performed. **Results:** Of the 312 samples that were analyzed by RT-PCR 87 (26.9 %) it was possible to amplify a product of 766 bp specific to the influenza virus gene 7. In other hand, of 713 analyzed serums 210 (29.4 %) showed reactivity with rM1 protein obtained from the sample Y10. However, only 7 (4.3 %) showed reactivity when the protein rM1 were used as antigen from the Y8 sample protein, which has an 98 % identity with rM1 of Y10. **Conclusion:** These results show that differences up to 4 amino acids could generate antigenic variation among strains of influenza virus type A.

## 1. INTRODUCCIÓN

La influenza aviar (IA) es una enfermedad emergente contagiosa causada por el virus influenza. Esta enfermedad resurge como uno de los principales problemas de salud mundial tanto en la población animal como humana (Ming-Shiuh *et al.*, 2001). La IA es causada por el virus influenza tipo A. Pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se clasifican en tres tipos (A, B,C) basándose en las características antigénicas de dos de sus proteínas internas (M y NP). Influenza tipo A a su vez se clasifica en subtipos de acuerdo a dos proteínas de superficie: la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) (Ming-Shiuh *et al.*, 2001). La influenza resurge cada año como uno de los principales problemas de salud y económico a nivel mundial. La IA es distribuida alrededor del mundo principalmente durante los procesos migratorios de las aves silvestres. La diseminación geográfica de los virus de IA dependen mayormente de los patrones de recombinación del virus y el comportamiento migratorio de las aves infectadas (Lebarbenchon *et al.*, 2009). Aves de los órdenes *Anseriformes* y *Charadriiformes* presentan una mayor prevalencia del virus influenza. De ellos, aves de la familia *Anatidae* que en su mayoría son migratorias, son la principal vía de diseminación del virus a través del mundo (Maxted *et al.*, 2012). Las aves infectadas de estos grupos pueden transmitir sus patógenos a otras aves o mamíferos en sus sitios de descanso o áreas de invernación. Estos a su vez los distribuyen en nuevas zonas geográficas (Montalvo-Corral *et al.*, 2010). Por lo tanto, la alta prevalencia del virus de IA está asociada a ambientes acuáticos, la cual puede ser debida a la eficiente transmisión a través de la vía fecal-oral en los humedales (Webster *et al.* 1992, 2007). Aves de la familia *Gallinacea* presentan mayor susceptibilidad a la infección por cepas patógenas del virus. Durante los procesos infecciosos dentro de estos individuos las variaciones antigénicas se acumulan en las proteínas de superficie H y N originando las distintas cepas virales de alta patogenicidad (H5, H7, H9) (Ma *et al.*, 2010). Las aves acuáticas migratorias son los hospederos naturales del virus influenza tipo A albergando 16 de los 18 subtipos que han sido identificados hasta la fecha (Tong *et al.*, 2012, Tong *et al.*, 2013).

En los últimos años los estudios de epidemiología molecular han revelado la presencia de nuevos subtipos del virus de la influenza en murciélagos (Tong *et al.*, 2013). Hasta antes

del 2010 solo era posible detectarlos en aves, principalmente migratorias. Lo anterior es una evidencia de la emergencia de nuevos subtipos. Las mutaciones puntuales acumuladas, la capacidad que tiene el virus para recombinar su genoma, y la capacidad de reconocer diferentes hospederos, le permiten cambiar periódicamente el riesgo latente de pandemias y panzootias. De los antígenos del virus influenza, la proteína de matriz M1 se ha utilizado ampliamente para la identificación del virus ya que eventualmente presenta una menor variabilidad genética y antigénica siendo además la proteína más abundante del virión. Esta proteína es vital en la morfogenesis del virus y por su estabilidad es la proteína de elección para la para la identificación del virus de la influenza tipo A. No obstante, los estudios epidemiológicos se enfocan principalmente en determinar que subtipos se encuentran circulando en la población aviar migratoria y no determina si las variaciones que se llegan a acumular en las proteínas internas afecten a niveles antigénicos. Por tal motivo, este trabajo se enfocó determinar si la acumulación de mutaciones puntuales se asocian a variaciones antigénicas en la proteína de matriz M1 del virus influenza, y determinar si esos cambios pueden impactar antigénicamente y por consecuencia permitirle escapar a la identificación oportuna y precisa de este patógeno.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades

Los virus influenza aviar (VIA) son altamente específicos para cada especie, sin embargo en algunas ocasiones dadas las características propias del virus puede cruzar la barrera entre las especies para infectar a los seres humanos (Maxted *et al.*, 2012). En las aves de corral, la infección por VIA causa dos formas principales de enfermedades de acuerdo a la patogenicidad viral:

- Los denominados virus de baja patogenicidad. Generalmente causan solo síntomas leves lo que dificulta su detección (Brochet *et al.*, 2009).
- Los virus de alta patogenicidad. Estos virus presentan una rápida propagación en las granjas avícolas, causando alteraciones a múltiples órganos internos, por lo que tiene una mortalidad que puede acercarse a un 100% dentro de un plazo de 48 hrs (Brochet *et al.*, 2009).

### 2.2 Genoma

El genoma del virus influenza A tiene un tamaño aproximado de 13,600 nt. Está constituido por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla con polaridad negativa (ssRNA). El segmento más pequeño presenta aproximadamente 890 nt (segmento 8), mientras que el de mayor tamaño está constituido de 2341 nt (segmento 1). Cada uno de los segmentos forma un complejo ribonucleoproteico con la proteína NP y tiene unida la tríada PB1, PB2 y PA que constituye la ARN polimerasa viral (RpDR). Los segmentos 2-6 son monocistronicos ya que codifican cada uno para una proteína (PB2, PA1, H, NP, N respectivamente) el segmento 1 puede codificar para una o dos proteínas (PB1 y PB1-F2), mientras que los segmentos 7 (M1, M2, M3) y 8 (NS1, NS2, NEP) pueden codificar hasta tres proteínas cada uno. (Rossman y Lamb, 2011). Éstas 13 proteínas se sintetizan en la célula durante el ciclo replicativo del virus y tienen funciones intracelulares.

Algunas de las proteínas virales sufren modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación como es el caso de la hemaglutinina y neuraminidasa (Qi *et al.*, 2009).

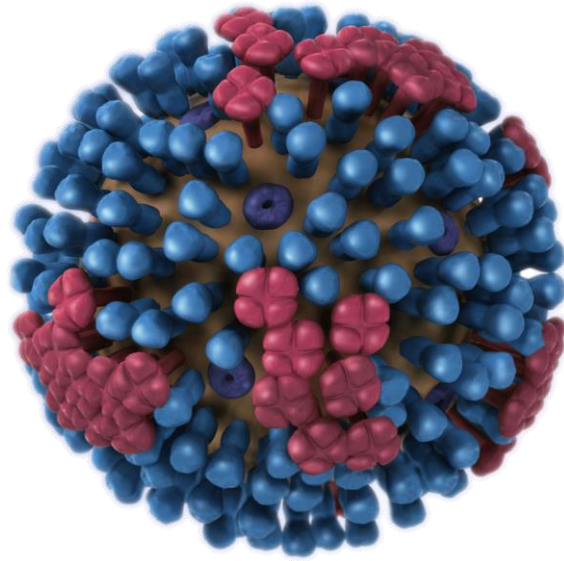
### **2.3 Taxonomía**

Los virus influenza, pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, la cual se subdivide en cuatro géneros: virus de influenza A, virus de influenza B, virus de influenza C y virus Thogoto. Esta clasificación se basa en las características antigénicas de dos de sus proteínas internas (M y NP) (Jindal *et al.*, 2009). A su vez el virus influenza tipo A se divide en subtipos. Esta clasificación en subtipos es en base a las características antigénicas de sus proteínas de superficie (HA y NA). A la fecha 18 subtipos hemaglutinina y 11 subtipos neuraminidasa se han identificado. Los subtipos 1-16 subtipos de H y 1-9 de N han sido identificado en aves migratorias (Tong *et al.*, 2013) mientras que los restantes en dos especies de murciélagos fructíferos en Centroamérica y Sudamérica.

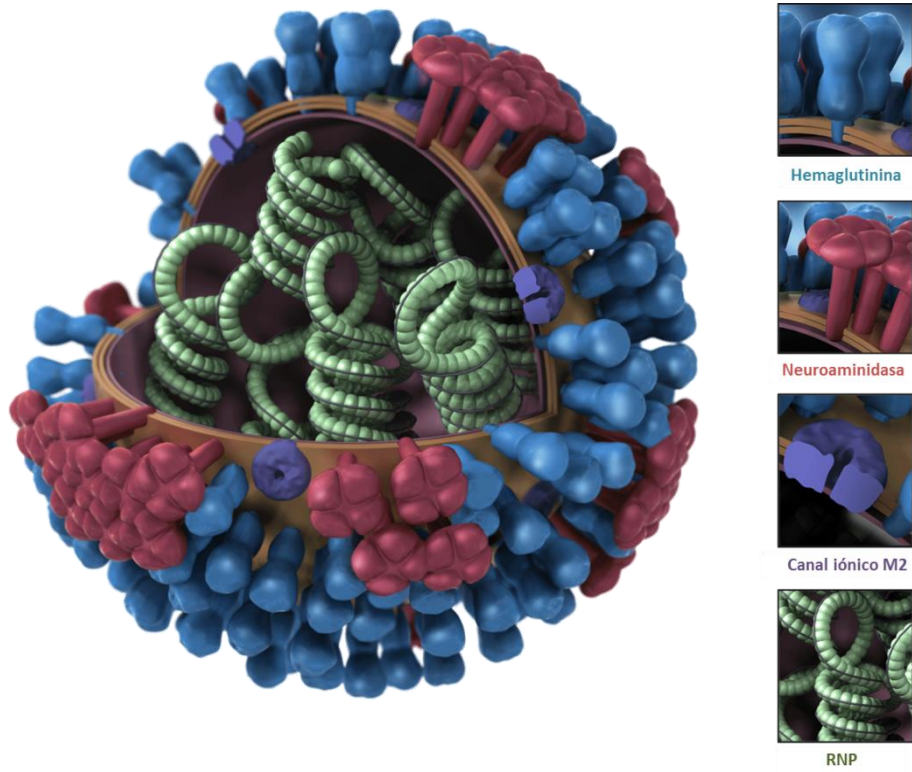
### **2.4 Estructura viral**

El virus influenza tipo A mediante microscopia electrónica se le determinó una apariencia pleomorfa, la cual posee un diámetro promedio de 100 nm. Esta partícula viral se encuentra envuelta por una bicapa lipídica la cual obtiene de la célula donde se replicó el virus. A través de esta bicapa se encuentran insertadas las glicoproteínas H y N y en una menor proporción la proteína transmembranal M2 (Figura 1).

Al interior de esta bicapa lipídica se encuentra una capa proteica formada por la proteína de matriz M1, la cual protege el genoma viral en el interior (Steel *et al.*, 2009). El genoma viral está recubierto por la nucleoproteína y RpdR. Este es un complejo proteico formado por dos proteínas alcalinas (PB1, PB2) y una ácida (PA) (Figura 2).



**Figura 1.** Estructura externa del virus influenza tipo A.



**Figura 2.** Estructura interna del virus influenza tipo A.

## **2.5 Composición del virus**

Los influenzavirus del grupo A, son virus envueltos que tienen aproximadamente 80 a 120 nm de diámetro formando estructuras esféricas o pleomorficas. El virión maduro está compuesto químicamente por aproximadamente 1 % de RNA, 70 % de proteínas, 20 % de lípidos y entre 5 a 8 % de carbohidratos (Steel *et al.*, 2009). Una de las características más sobresalientes de la superficie viral son las aproximadamente 500 espículas radiales (de 10 a 14 nm) de HA que se proyectan hacia el exterior. La relación HA/NA varía, aunque generalmente es de 4:1 o de 5:1 (Zamarin *et al.*, 2007).

## **2.6 Proteínas virales y patogénesis**

Varias de las proteínas virales juegan un papel importante en algunos de los aspectos de restricción de huésped y patogenia de los virus de influenza. Estas incluyen la habilidad de modular el sistema inmune del huésped y la capacidad de replicarse eficientemente a bajas temperaturas. Las proteínas mejor caracterizadas en cuanto a su potencial patogénico son la H, PB1 y PB2. Por otro lado, las proteínas N y M2 han sido muy estudiadas, dada su capacidad de conferir resistencia a las drogas antivirales (Zamarin *et al.*, 2007).

### **2.6.1 Hemaglutinina**

Esta glicoproteína, junto con la neuraminidasa, es una de las proteínas mayoritarias de la partícula viral. Es el principal antígeno de neutralización; es decir, que la mayoría de los anticuerpos producidos en personas infectadas van dirigidos contra esta proteína y son capaces de neutralizar la infectividad del virus. La hemaglutinina, como su nombre lo indica, es capaz de aglutinar eritrocitos, propiedad que ha sido utilizada para la clasificación de los diferentes serotipos de virus (Nitar *et al.*, 2006). La hemaglutinina juega un papel muy importante durante la entrada del virus a su célula huésped. Por una parte media la unión del virus a la superficie celular, a través de su interacción con ácido sálico.



La H se sintetiza como una proteína precursora llamada H0, que es proteolíticamente cortada en H1 y H2 en un sitio específico de la proteína. Este corte, resulta en la activación de la infectividad del virus y se ha observado que a diferencia de las cepas de baja patogenicidad, las cepas de alta patogenicidad tienen no sólo uno, sino varios aminoácidos básicos en el sitio de corte, lo que las hace particularmente susceptibles a ser activadas proteolíticamente, y por lo tanto, más infecciosa. El corte proteolítico es esencial para la infectividad, ya que expone un péptido hidrofóbico en el amino terminal de H2, que es responsable de mediar la fusión de las membranas viral y celular (Nitar *et al.*, 2006).

### **2.6.2 Proteína PB2, PB1 y PA**

Estas proteínas, forman el complejo de replicación del virus. Esta proteína se ha asociado con la transmisibilidad del virus, a través del aire y también con la restricción de huésped. Se ha observado que cepas que tienen ácido glutámico en la posición 627 son menos transmisibles que aquellas PB2 que tienen un residuo de lisina en la misma posición (Steel *et al.*, 2009). También se ha reportado, que virus que tienen una lisina en la posición 627 crecen mejor en células de mamífero, que aquellos que tienen ácido glutámico. La lisina en la posición 627 le confiere al virus una eficiente replicación a 33°C, que es la temperatura de las vías aéreas superiores en humanos, mientras que a 41°C, la temperatura corporal de las aves, no se observó diferencia en la eficiencia de replicación de variantes con ácido glutámico o lisina en esta posición (Hatta and Hatta, 2007). Estos datos sugieren que la transmisión eficiente de virus de influenza A, en humanos, se favorece por la selección de variantes del virus con mutaciones glutámico-lisina en el aminoácido 627 en la proteína PB2 (Li *et al.*, 2006).

### **2.6.3 Proteína PB1-F2**

Es una proteína pequeña codificada por el gen que también codifica por la subunidad PB1 de la polimerasa viral. La PB1-F2 se expresa en la mayoría de las cepas de influenza A. Se ha encontrado que esta proteína interacciona con la membrana de las mitocondrias,

causando su permeabilización y la liberación del citocromo C, lo que induce la muerte celular (Chen *et al.*, 2001). También se ha reportado que PB1-F2 aumenta la respuesta inflamatoria durante la infección viral en ratones.

#### **2.6.4 Proteína de matriz M2 o Canal iónico**

La proteína M2 es la menos abundante de la cubierta viral. Esta proteína funciona como canal iónico, que permite la entrada de protones al interior de la partícula viral facilitando la liberación del genoma del virus y sus proteínas asociadas, para que éste sea importado al núcleo e inicie su replicación. M2 es el principal blanco de las drogas antivirales conocidas como adamantanos, cuya actividad es la de bloquear selectivamente el canal formado por M2, lo que inhibe la liberación, y por lo tanto la replicación del genoma viral (Varghese *et al.*, 1983). Estos compuestos han sido el tratamiento de elección contra brotes de influenza por muchos años; sin embargo, se ha encontrado que la resistencia a los adamantanos aparece rápida y frecuentemente en cepas silvestres del virus de la influenza (Palese *et al.*, 2001).

#### **2.6.5 NS1**

Durante la replicación viral, se dispara la activación de factores transcripcionales, que estimulan la producción de interferón  $\beta$ , ésta es una medida de la célula para prevenir las infecciones virales. La proteína NS1, es una proteína viral que antagoniza la respuesta de interferón de la célula (Palese *et al.*, 2001). El mecanismo a través del cual NS1 ejerce su función, no se ha esclarecido completamente, aunque se ha encontrado que cepas altamente virulentas, como la cepa aviar H5N1, además de conferir resistencia a los efectos antivirales del interferón, inducen una respuesta exacerbada de citosinas proinflamatorias (Jiao *et al.*, 2008). En conjunto, estas observaciones indican que las proteínas NS1 de cepas altamente patogénicas son capaces de causar un desbalance en la producción de citosinas por parte del huésped, lo que complica el cuadro clínico del

paciente. Se ha descrito que la presencia de ácido glutámico en la posición 92 de NS1 correlaciona con la alta patogenicidad de algunas cepas aviares (Seo *et al.*, 2002).

### **2.6.6 Neuraminidasa**

Esta glicoproteína es una sialidasa, cuya función es la de remover el ácido siálico celular de las glicoproteínas virales de los virus recién sintetizados, así como los receptores de ácido siálico presentes en la superficie celular, lo que permite la eficiente liberación del virus de la célula infectada, para así poder infectar nuevas células (Wright *et al.*, 2006). La inhibición de la actividad de esta proteína provoca que los virus producidos en una célula se mantengan unidos a la superficie de la célula y agregados entre sí, lo que inhibe su diseminación (Palese *et al.*, 2001).

## **2.7 Variabilidad antigénica**

Los virus de influenza sufren constantes variación antigénicas en sus proteínas de superficie las cuales le permiten escapar a la respuesta inmune del huésped, a diferencia de otros virus respiratorios, el virus influenza tiene dos mecanismos principales de variación antigénica, los cuales son conocidos como drift y shift antigénico.

### **2.7.1 Shift antigénico**

Las mutaciones en los determinantes antigénicos de las glicoproteínas de la envoltura viral dan sustento a las variaciones antigénicas, que se conocen como “drift antigénico”. Éste ocurre por la acumulación de mutaciones puntuales de nucleótidos, en particular en el segmento que codifica para la HA y que resulta en sustituciones de aminoácidos en los determinantes antigénicos; de ello se deriva la imposibilidad para que puedan unirse los anticuerpos generados por infecciones o inmunizaciones previas (Ellis *et al.*, 2002). Típicamente una RNAPol viral resulta en una tasa de mutación de aproximadamente un

cambio por cada genoma copiado ( $7.3 \times 10^{-5}$  mutaciones/nucleótido replicado) es decir, que introduce una mutación por cada mil o 100 mil nucleótidos copiados. Los virus de la influenza tipo A muestran el mayor número de mutaciones acumuladas a través del tiempo, mientras los genomas de los virus de la influenza C tienen poca variabilidad, incluso si se han aislado con décadas de separación (Nitar *et al.*, 2006). En los virus de influenza A las tasas de evolución son diferentes para cada segmento, lo cual probablemente refleja la diferente presión de selección por parte del huésped para cada proteína. Los genes de la hemaglutinina, la neuraminidasa y la M2, evolucionan más rápidamente que los demás (Palese *et al.*, 2001). Se ha calculado que la tasa de evolución, esto es, la fijación de mutaciones de las proteínas H y N es alrededor del 1% anual. Es claro que muchas de estas mutaciones se mantendrán silenciosas (sin efecto en funcionalidad), pero algunas de ellas se traducirán en cambios significativos en la proteína correspondiente. La comparación de aminoácidos de la proteína HA de virus porcinos mostró que entre 1976 y 1982 las mutaciones provocaron nueve cambios de aminoácidos en esta proteína. Otras observaciones sugieren que el subtipo H1 porcino tiene cambios más lentos que el H1 o H3 de virus humanos (Yuen *et al.*, 1998).

### **2.7.2 Shift antigénico**

Como el virus influenza tiene un genoma segmentado esto permite que durante una infección natural por dos cepas diferentes estas puedan intercambiar segmentos completos (antigenic shift) con otras variantes virales y generar nuevas entidades (Nitar *et al.*, 2006). Esta característica del genoma de influenza facilita que cuando dos virus con diferentes subtipos de H y N infectan a un mismo animal, los genes de ambos virus puedan mezclarse y producirse nuevos virus, conocidos como rearrreglantes por haber experimentado un rearrreglo de genes, con combinaciones de H y N diferentes a las de los virus originales (Palese *et al.*, 2001). Algunos de estos virus tendrán la capacidad de infectar humanos y en ocasiones mediante eventos mutagénicos podrán adaptarse a ser transmitidos directamente entre ellos (Allen *et al.*, 2009). Este es un cambio antigénico brusco que puede resultar en la introducción de un nuevo subtipo de H y/o de N en la

población humana. Cuando esto sucede, los nuevos subtipos de H y/o N pueden representar proteínas inmunológicamente diferentes a la de las cepas que estaban en circulación. Si este fuera el caso, usualmente se da una alta incidencia de infección en la población que no tiene anticuerpos contra la nueva cepa de virus, generándose potencialmente una pandemia o panzootia.

Algunos de estos virus tendrán la capacidad de infectar humanos y en ocasiones mediante eventos mutagénicos podrán adaptarse a ser transmitidos directamente entre ellos (Allen *et al.*, 2009). Esto más que ser un evento raro ocurre con frecuencia en la naturaleza y es tal vez el principal origen de cepas con potencial pandémico.

Los cerdos han sido considerados por mucho tiempo el intermediario más importante y la fuente principal de nuevas variantes de virus de la influenza (Nitar *et al.*, 2006). Sin embargo, en años recientes se han presentado que pueden ser transmitidas directamente por las aves, como lo fue la cepa del virus H5N1 que causó importantes brotes epidémicos en 2003 en Asia. De hecho, se cree que éste es el primer paso de un virus zoonótico antes de que adquiera la capacidad de ser transmitido de humano a humano (Rabadan *et al.*, 2008).

## **2.8 Tropicismo Viral**

En humanos, el virus normalmente ingresa al organismo por nariz o boca e infecta las células que recubren el tracto respiratorio, uniéndose a ácido siálico (AS) en la superficie de las células para iniciar la infección (Palese *et al.*, 2001). El AS es una molécula muy abundante en todas las células, que forma parte de cadenas de azúcares unidas a proteínas o lípidos, y define el tropismo de los virus de influenza. Esto ocurre debido a la especificidad que tienen diferentes cepas de virus por diferentes tipos de enlaces del AS con el azúcar, que los precede en la cadena de carbohidratos, que generalmente es galactosa. Así, los virus aislados de humanos se unen, preferentemente, a ácidos siálicos en unión  $\alpha$  2,6 con la galactosa, mientras que los virus aviares se unen a ácidos siálicos con unión  $\alpha$  2,3.

Las células epiteliales que recubren la tráquea humana tienen principalmente AS con enlaces  $\alpha$  2,6, mientras que las células epiteliales del intestino de aves acuáticas, que es donde se replica el virus en estos animales, tienen principalmente AS en enlace  $\alpha$  2,3 por lo que la afinidad por AS explica en parte la restricción de huésped de los virus de influenza (Nitar *et al.*, 2006).

En las células epiteliales de la tráquea de los cerdos existen ambos tipos de enlaces del AS, lo que favorece que el cerdo pueda ser naturalmente infectado, tanto por virus porcinos como por virus de origen aviar y humano, lo que resulta, como se mencionó anteriormente, que en esta especie animal se puedan generar frecuentemente rearrreglos genéticos que dan lugar a virus de influenza con combinaciones de diferentes hospederos.

## **2.9 Ecología del virus influenza**

La mayoría de las combinaciones que hasta el momento han sido descubiertas dentro de la clasificación de subtipos del virus influenza ha sido identificada en aves acuáticas migratorias. Esta información revela que las aves migratorias juegan el papel principal en la distribución del virus alrededor del mundo. Análisis de las secuencias de virus influenza de origen aviar muestran linajes distantes entre los virus circulantes de Europa y Asia con aquellos que circulan en el continente americano, esto debido a que las rutas migratorias intracontinentales son más importantes que las intercontinentales en la difusión global del virus. La eventualidad de introducción de cepas aviarias a otra ruta migratoria y por consiguiente la introducción de cepas aviarias de aves acuáticas a las aves de la familia *Gallinaceae* (aves de corral generalmente), estas aves son muy susceptibles a la infección por el virus, por lo que en ocasiones la infección a estos individuos genera en el virus algunos cambios genéticos de adaptación, estas características principalmente son las que adoptan los subtipos de alta patogenicidad (H5, H7, H9) permitiéndoles una rápida diseminación entre las aves facilitando la replicación del virus causando una elevada mortalidad (Bouvier *et al.*, 2008). Las características genéticas de las aves silvestres es diferente al de las aves domésticas, por lo que son un poco más susceptibles y al ingresar el virus a una especie diferente busca la manera de

establecerse, empleando métodos de selección como las mutaciones para establecerse. Se ha identificado que los virus que infectan aves migratorias han mantenido a un estado de latencia. Sin embargo el reconocimiento de nuevos subtipos de hemaglutinina en aves silvestre, indicando que estos cambio pueden ser mayores, basándose en que los subtipos H13, H14 y H15 que fueron identificados en patos silvestres y la última descubierta en aves que fue la H16 en una gaviota marina. Por otra parte en Asia se ha identificado que el virus H5N1 ha sufrid reasociaciones genéticas mediante el intercambio genético ha permitido la generación de diferentes y nuevos linajes alrededor del mundo. En patos silvestres los virus se replican principalmente en las células del tracto intestinal, secretando el virus en altas concentraciones cercanas a  $10^8$  dosis infectantes en embriones de pollo (DIEP) 50% /gm. Las aves domésticas se consideran especies aberrantes que ocasionan que el virus mute con mayor facilidad, como un mecanismo de adaptación para asegura la replicación y transmisión en la nueva especie. Los gansos, patos y pavos domésticos aparentemente son los que son infectados primeramente por las cepas que infectan a las aves silvestres (Swayne & Suarez *et al.*, 2000). Los virus se difunden con más facilidad entre las aves de traspatio lo que ocasionalmente provoca la difusión a las granjas avícolas. Descripciones de infecciones en mamíferos marinos como focas y ballenas, mamíferos terrestres como cerdos, caballos, visones, tigres, leopardos, gatos, humanos y recientemente en perros se encuentran en la literatura. El hombre tiene un papel importante en la ecología viral como trasmisor directo o indirecto, trasportando mecánicamente al virus, por el uso de ropa, equipos ó vehículos infectados y por el contrabando de aves silvestres, de ornato, de pelea y comerciales (Buscaglia, 2004).

### **2.10 Generalidades del gen 7 del virus influenza tipo A**

El segmento número 7 del virus influenza tipo A codifica para 3 proteínas. Este gen acumula tantos cambios secuencia como otros genes como el gen 4 que codifica para la hemaglutinina, por lo que esta estabilidad ha sido clave para emplearlo en la tipificación del virus. Este gen sufre un splicing alternativo lo cual le confiere la capacidad de codificar para las 3 proteínas denominadas M1, M2 y M3. Estructuralmente el gen 7 está

constituido por 1027 pb, de entre las cuales el marco de lectura inicia en el nucleótido número 26 y termina en el 784, lo cual genera una proteína de 253 aminoácidos (M1). Análisis evolutivos del gen 7 muestran que la región codificante de la proteína M1 presenta en general cerca de un 99 a un 100% de identidad, sin embargo, análisis de secuencias de este gen provenientes de aves silvestres muestran una variación de hasta el 7% en su secuencia de aminoácidos (Jindal et al., 2009).

## **2.11 Importancia biológica de la proteína M1**

La proteína M1 es la más abundante del virus influenza (Furuse *et al.*, 2009). Esta proteína desempeña el papel de soporte, anclaje y protección del genoma del virus, debido a que se forma una capsida alrededor del genoma viral (Sha B. y Luo, 1997). Por otra parte la proteína M1 tiene participación en el ciclo de replicación del virus. Primero esta proteína cuando el virus ingresa a la célula hospedero por vía endosomal y el interior comienza a acidificarse por entrada de iones Hidrogeno por el canal iónico M2, la proteína M1 sufre un cambio conformacional que favorece a la liberación del vRNP hacia el citoplasma de la célula huésped (Zhirnov *et al.*, 1992) para así posteriormente migrar hacia el núcleo del huésped para finalizar con la replicación del genoma. Una vez que el genoma se encuentra dentro del núcleo, se inicia la replicación de este y la síntesis de las proteínas del virus.

### **2.11.1 Síntesis de la proteína M1**

La proteína M1 se sintetiza mediante un splicing alternativo a partir del segmento 7, el cual como se mencionó anteriormente codifica para la proteína M1, M2 y recientemente se descubrió que codifica para la proteína M3 de la cual se desconoce la función que tiene (Ito *et al.*, 1991). Una proporción de la proteína M1 que se ha sintetizado se dirige hacia el núcleo celular y la otra parte se dirige hacia la membrana celular (sitio de ensamblaje del virus). El proceso de importación de esta proteína al núcleo se ve favorecida a una secuencia consenso entre los aminoácidos 101-105 (RKLKR) los cuales se encuentran



dentro la hélice numero 6 de la proteína, siendo este péptido señales de localización nuclear las cuales son reconocidas por las proteínas del complejo del poro nuclear para importar la proteína al núcleo, donde esta proteína va a desempeñar las siguientes funciones:

### **2.11.2 Regulación de la transcripción del genoma viral.**

Se ha demostrado que la proteína M1 tiene afinidad al ARN de cadena sencilla (Wakefieri *et al.*, 1989). En estudios *in vitro* se observó que esta proteína inhibe la síntesis de ARN catalizado por el complejo ribonucleoproteico cercana al 50%, identificando las ultimas 2/3 partes de M1 de la región carboxilo terminal (Ye *et al.*, 1987). Sin embargo otros autores proponen que los aminoácidos encargados de la inhibición de la transcripción está dada por los aminoácidos que se encuentran entre los residuos 70 y 140 (Hankins *et al.*, 1989).

### **2.11.3 Interacción de M1 con caspasas.**

En estudios *in vitro* se determinó que esta proteína interactúa con la caspasa 8, la cual posee actividad proapoptotica. Se propuso que M1 podría inhibir la activación de esta caspasa y por lo tanto prevenir el proceso de apoptosis (Zhirnov *et al.*, 2002).

### **2.11.4 Interacción con histonas.**

Mediante un estudio *in vitro* se demostró que la proteína M1 interactúa preferentemente con las histonas H2A, H2B, H3, H4 y débilmente con la H1 (Zhirnov *et al.*, 1997). Esta interacción se da mediante fuerzas electrostáticas por los primeros 9 aminoácidos del extremo amino y los últimos 18 del extremo carboxilo de M1, teniendo esta capacidad de unión a las histonas. Hasta el momento no se ha determinado esta interacción *in vivo*, sin embargo se cree que podría existir una interacción M1-nucleosoma. Por otra parte se propone que la proteína M1 podría estar a su vez regulando la transcripción de algunos de los genes de la célula huésped durante el ciclo replicativo.

### **2.11.5 Interacción con el complejo vRNP**

La proteína M1 se encuentra asociada tanto al v RNP como a la estructura viral, por lo que dentro del núcleo de la célula infectada se puede encontrar esta proteína asociada al vRNP (Rees et al., 1981). Es importante la presencia de M1 y su interacción con el vRNP, ya que favorece la exportación del núcleo celular al citoplasma, donde será transportada hacia el sitio de ensamblaje viral, a regiones ricas en colesterol, donde previamente se han anclado las proteínas de superficie (HA, NA y M2) mediante un mecanismo aun desconocido. Sin embargo esta unión es importante para evitar el reingreso del vRNP al núcleo (Whittaker et al., 1996).

### **3. HIPOTESIS**

Cepas del virus influenza tipo A circulante en aves migratorias y residentes presentan variaciones genéticas y antigénicas en la proteína de matriz M1.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la presencia de variantes antigénicas del virus influenza tipo A circulante en aves migratorias y residentes de México.

### **4.2 Objetivos particulares**

- 1) Determinar la presencia del virus influenza tipo A en aves migratorias y residentes de México.
- 2) Amplificar, clonar y secuenciar la región codificante de M1 del segmento 7 del genoma viral.
- 3) Producir y purificar proteínas de matriz M1 del virus influenza aviar.
- 4) Producir y evaluar anticuerpos policlonales contra la proteína rM1 del virus influenza A.
- 5) Evaluar la reactividad de suero de aves migratorias y residentes en dos variantes genéticas de proteínas M1 recombinante.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Muestras de Heces y Sueros**

Se utilizaron cepas del virus influenza obtenidas a partir de muestras cloacales, las cuales fueron donadas por el laboratorio de biología de la conservación para la producción de proteínas recombinantes, estas fueron colectadas en diferentes localidades de Coahuila, Nuevo León, Durango, Tamaulipas y Yucatán. Los sueros utilizados pertenecen a la colección colectada durante el periodo 2010-2013 por este mismo departamento, correspondiendo a los individuos de los cuales se tomó la muestra de heces.

### **5.2 Extracción de ARN viral.**

Se realizó la extracción de ARN del virus Influenza de muestras de heces procedentes de aves migratorias y residentes del Norte de México, utilizando dos métodos combinados de extracción:

### **5.3 Método de Trizol:**

Se colocaron  $\approx 200$   $\mu\text{L}$  de la suspensión de heces PBS-Albumina, previamente centrifugado a 12,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se depositó en un tubo de micro centrifuga de 1.5 mL y se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de TRIZOL a 4°C, se mezcló por inversión de 5-6 veces y después se incubo en hielo durante 5 min, posteriormente se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo para nuevamente mezclar por inversión de 5-6 veces, una vez más se incubo durante 3 min en hielo, una vez realizado esto se centrifugo a 12,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, después se extrajo la fase acuosa y se depositó en un tubo de micro centrifuga de 1.5 mL limpio.

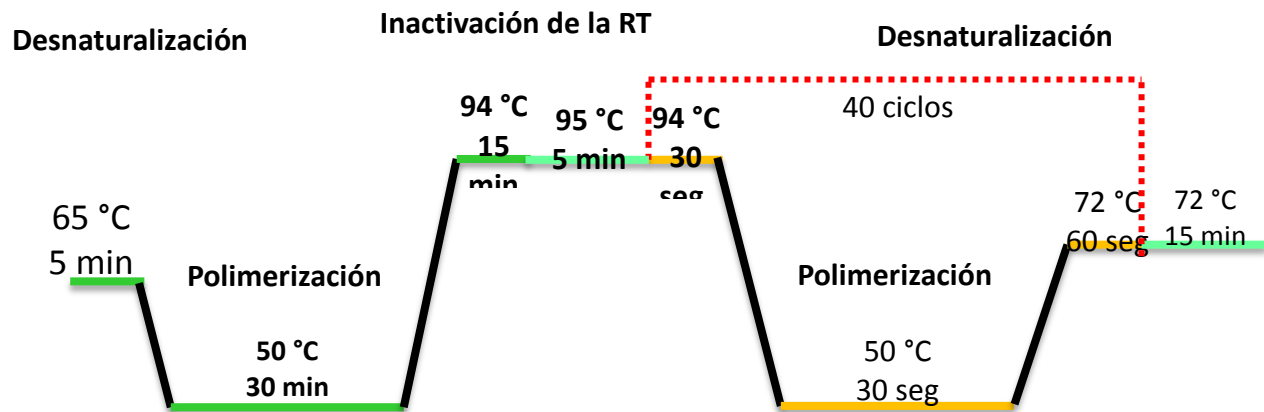
#### **5.4 Método QIAamp viral RNA QIAGEN® (Kit comercial):**

En un tubo de micro centrifuga de 1.5 mL se colocaron 560 µL de solución amortiguadora AVL más 5 µL de solución carrier (almacenada a -20°C), a este tubo se le adicionaron 140 µL de la fase acuosa del procedimiento anterior, después esta mezcla se sometió 1 instante en vortex 15 veces, posteriormente se incubo a temperatura ambiente durante 10 min, inmediatamente se procedió a centrifugar a 8000 rpm por 5 min, se añadieron 560 µL de etanol absoluto y se depositaron 630 µL de esta mezcla en una columna QIAmp, rápidamente se centrifugo la columna con un tubo colector a 8,000 rpm por 1 min, una vez centrifugado se descartó el tubo colector, se repitió este punto dos veces y se agregaron 500 µL de solución amortiguadora AW1 a la columna para centrifugarla a 8,000 rpm por 1 min, se descartó el contenido del tubo colector, inmediatamente se adicionaron 500 µL de solución amortiguadora AW2, después se centrifugo a 14,000 rpm por 3 min, una vez hecho esto, se transfirió solamente la columna a un nuevo tubo de micro centrifuga de 1.5 mL estéril y etiquetado, finalmente se adicionaron a la columna 60 µL de solución amortiguadora AVE para la elución de la matriz, se dejó incubando por 1 minuto para posteriormente ser centrifugado durante 1 min, el nuevo tubo fue guardado a -20°C hasta su utilización o para utilizarse en ese momento.

#### **5.5 Amplificación de la fracción del gen 7 del virus Influenza para su tipificación.**

El ARN previamente purificado se sometió a una reacción de RTPCR de un solo paso utilizando un mix enzimático del kit OneStep RT-PCR (QIAGEN®). Se emplearon los oligonucleótidos con sitios de restricción BamH I y Sal I con secuencias consenso para el gen 7 del virus influenza: Forward M30F2/08 5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG-3' (en sentido) y FLU M264R3/08 5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3' (antisentido). La mezcla de reactivos para una

reacción se realizaron en tubos de microcentrífuga de 0.2 mL conteniendo 5.0  $\mu$ L de ARN, 5.0  $\mu$ L de solución amortiguadora 5XQ, 1.5  $\mu$ L de cada oligonucleótido (M30F2/08 y M264R3/08) a una concentración de 10  $\mu$ M cada uno, 5.0  $\mu$ L de solución amortiguadora 5XQ (QIAGEN<sup>®</sup>), 1.0  $\mu$ L de una mezcla de dNTP's (QIAGEN<sup>®</sup>), 1.0  $\mu$ L del mix enzimático (QIAGEN<sup>®</sup>) y 10.0  $\mu$ L de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 25  $\mu$ L. Posteriormente la mezcla de reactivos se colocaron en un termociclador (TERMOHYBAID PCRspring) se realizará la amplificación con un programa de 50 °C /30 min, 95 °C /15 min, 40 ciclos: 94 °C/30 S, 50°C/30 S, 72°C /30 S; 72 °C /10 min (Figura 3). Al final se añadirá un tiempo de extensión de 5 min, para permitir que se adicione al extremo 3'-OH para analizar la amplificación del producto de PCR, se realizará una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 V constantes por 50 min. El gel de agarosa será teñido con bromuro de etidio durante 15 min y revelado con luz ultravioleta en el transluminador (UVP, Transilluminator).



**Figura 3.** Esquema de temperaturas para la tipificación del virus influenza tipo A.

### 5.6 Clonación del gen de matriz.

La clonación del producto de PCR de 264 pb del gen 7 del virus Influenza que codifica para la proteína M1 se realizaron con el plásmido pGEM-T mediante el Kit de Clonación pGEM-T Vector System (Promega). El producto de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa LowMealting 1.5% a 100 V constantes por 1 hora, seguida de una tinción con bromuro de etidio por 15 min. Utilizando una lámpara de luz ultravioleta (UVP, Transilluminator) con baja intensidad se cortó el fragmento con la banda de interés, estos fragmentos se depositaron en un tubo de centrifuga y se purificaron utilizando el Kit WizardR SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

### **5.7 Ligación del producto de PCR al plásmido pGEM-T.**

Se realizó en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL, para una reacción se mezclaron: 5.0µL de solución amortiguadora T4 DNA Ligasa 2X (Promega), 0.5µL de plásmido pGEM-T (50ng/ µL), 3.0µL de producto de PCR purificado, 1.0 µL de enzima T4 DNA Ligasa 3 U/ µL y 0.5 µL agua nanopura estéril para obtener un volumen final de 10.0 µL. Los tubos se incubaron a 4°C toda la noche, como lo especifica el kit de clonación pGEM-T and PGEM-T EasyVectors (promega).

### **5.8 Transformación de E.coli DH5α competentes.**

Se mezclaron 100 µL de bacterias y 10 µL de la reacción de ligación en un tubo de centrifuga. Se agito suavemente el tubo y se incubo en hielo durante 30 min. El tubo se introdujo en baño de agua previamente calentado a 42°C por 90 S inmediatamente el tubo se volvió a incubar en hielo por 2 min. Se adicionaron 450 µL de medio de cultivo SOC (atemperado a 37°C). Se transfirió a un tubo de ensaye estéril de 13X100. Las bacterias se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante 1 hora. Posteriormente el cultivo de bacterias se regresó al tubo de micro centrifuga donde se realizó el shock térmico y se centrifugo un instante a 10,000 rpm. Se retiró el medio de cultivo y el pellet de bacterias fue resuspendido en 50 µL de medio de cultivo SOC. Los 50 µL de bacterias transformadas fueron inoculadas por el método de dispersión en placa en una caja de Agar LB adicionado con Ampicilina (50 µL/mL) con un asa triangular. Las cajas se incubaron a 37°C por 12 hrs.

### **5.9 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas.**

Se inocularon las colonias de bacterias en tubos de ensaye de 13X100 con 3 mL de Caldo LB/Ampicilina (50 µg/mL) utilizando palillos de madera estéril. Estos tubos se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm por toda la noche. Posteriormente en condiciones de esterilidad se tomaron 2 mL de cultivo de bacterias y se transferirán a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron a 8,000 rpm por 5 min y se



retirá el medio de cultivo. La purificación de plásmidos se realizará a partir del pellet de bacterias utilizando el método tradicional de lisis alcalina y el Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) para su secuenciación.

### **5.10 Análisis de plásmidos purificados.**

En condiciones de esterilidad se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron por 2 min a 14, 000 rpm, posteriormente se retiró todo el sobrenadante del pellet. El pellet fue suspendido en 300µL del buffer TE pH 8, el cual fue incubado por 3 minutos a temperatura ambiente, después se agregaron 300 µL de la solución desnaturizante mezclando por inversión 6 veces con un periodo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 300 µL de acetato de potasio 5.5 M de manera enérgica con la micropipeta, inmediatamente se incubo por 10 minutos en hielo. Una vez transcurridos los 10 min se centrifugo a 14,000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante del tubo y fue dividido en 2 tubos de microcentrifuga de 1.5 mL (400 µL aproximadamente), una vez dividido el sobrenadante se añadió 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión 6 veces y se incubo a -20 °C por 20 minutos, después se centrifugo a 14,000 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante por decantación sobre papel absorbente. Se agregaron 500 µL de etanol al 75% y se centrifugo a 14,000 por 10 min, de igual forma se retiró el sobrenadante en papel absorbente y se dejaron los tubos secando a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar por 20 minutos. Una vez formada la pastilla se suspendió en 25µL de agua mili Q. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.0%, a 100 V constantes por 50 min. El gel será teñido con bromuro de etidio por 15 min y se revelara con luz ultravioleta (UVP, Translluminator).

Para confirmar la presencia del inserto (264 pb) en los plásmidos purificados, se realizará un análisis mediante PCR y/o una reacción de restricción con las enzimas BamH I y Sal I. En el análisis por PCR se utilizarán los oligonucleótidos que se usaron para amplificar cada producto de PCR originalmente. La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL conteniendo 1.0 µL de plásmido purificado, 1.25 µL de Buffer NH<sub>4</sub> 10X (Bioline), 0.37 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.25 µL de cada

oligonucleótido a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  cada uno, 2.0  $\mu\text{L}$  de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5 mM cada uno, 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima DNA polimerasa 500 U/ $\mu\text{L}$  (Bioline) y 6.88  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 12.5  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reactivos se colocará en un termociclador (TERMOHYBAID PCR sprint), utilizándose el mismo programa de amplificación de los productos de PCR. En seguida se realizará una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 100 V constantes por 50 min. El gel será teñido con bromuro de etidio por 15 min y se revelará con lámpara de luz ultravioleta (UVP, Translluminator).

Para realizar el análisis de restricción, los plásmidos fueron mezclados con las enzimas de restricción BamH I y Sal I simultáneamente. La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL utilizando 0.5  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora REACT 3 10X de la enzima BamH I (Invitrogen), 7.0  $\mu\text{L}$  de plásmido purificado, 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima BamH I 10 U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen), 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima Sal I 10 U/ $\mu\text{L}$  (Promega) y 1.5  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reactivos se incubó a 37°C por 1.5 hrs y posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5%, a 100 V constantes por 50 min. El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 min y se reveló con luz ultravioleta (UVP, Translluminator).

### **5.11 Secuenciación del fragmente del gen de matriz.**

Para asegurar la presencia de la secuencia de nucleótidos del gen 7 (1-264nt), se realizó a partir de la construcción del plásmido pGEM-T/PCR-M1. Las clonas de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pGEM-T/PCR-M1 fueron inoculadas en tubos de ensaye de 13X100 con 3 mL de caldo LB/Ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm toda la noche. Posteriormente se purificaron los plásmidos a partir de todo el cultivo de bacterias (3 mL), utilizando el Kit WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Después se realizó una electroforesis de los plásmidos en gel de agarosa 1%, a 100 V constantes por 1 hora, para verificar la integridad y cantidad de los plásmidos purificados. Posteriormente se prepararon 1 mL de una dilución 1:200

de cada plásmido en agua nanopuraesteril (libre de sales) y se medirá la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta.

La concentración final de ADN para enviar a secuenciar fue ajustada a 750 ng/μL en agua nanopura estéril. La secuencia de nucleótidos se realizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, utilizando el secuenciador Perkin Elmer/AppliedBiosystems Modelo 3730 utilizando mediante el método basado en fluorescencia Taq FS Dye Terminador.

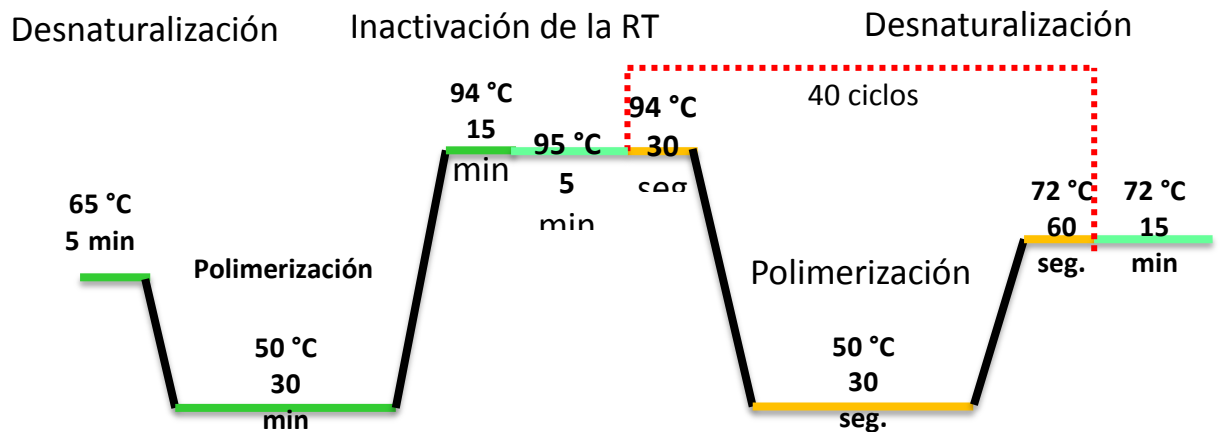
### **5.12 Análisis de secuencia de ADN.**

La secuencia de nucleótidos de las cepas de campo, primero fueron analizadas utilizando el software BLAST nucleotide (NCBI) para comprobar que el gen pertenece al virus Influenza aviar. Posteriormente, se realizó una comparación de la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos utilizando el programa CLUSTAL W / BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0 (Hall, 1999). Todas las secuencias de nucleótidos/aminoácidos obtenidas de las cepas del virus Influenza aviar, serán depositadas en el Nucleotide Sequence Database (GenBank).

### **5.13 Amplificación de la región codificante del gen 7 del virus Influenza.**

ARN previamente purificado se sometió a una reacción de RTPCR de un solo paso utilizando un mix enzimático del kit OneStep RT-PCR (QIAGEN®). Se emplearon los oligonucleótidos con sitios de restricción BamH I y Sal I con secuencias consenso para el gen 7 del virus influenza: FLUM1F 5'-CACGGATCCAAGATGAGTCTTCTAACCGAG-3' (en sentido) y FLU M1 R 5'-CACGTGCACAGGATCACTTGAATCGCTGCA-3' (antisentido). La mezcla de reactivos para una reacción se realizaron en tubos de microcentrífuga de 0.2 mL conteniendo 5.0 μL de ARN, 5.0 μL de solución amortiguadora 5XQ, 1.5 μL de cada oligonucleótido (FLUM1F y FLUM1R) a una concentración de 10 μM cada uno, 5.0μL de solución amortiguadora 5XQ (QIAGEN®), 1.0 μL de una mezcla de dNTP's (QIAGEN®), 1.0 μL del mix enzimático (QIAGEN®) y 10.0 μL de agua nanopura estéril

para completar un volumen final de 25  $\mu$ L. Posteriormente la mezcla de reactivos se colocaron en un termociclador (TERMOHYBAID PCRspring) se realizará la amplificación con un programa de 50  $^{\circ}$ C /30 min, 95  $^{\circ}$ C /15 min, 40 ciclos: 94  $^{\circ}$ C/30 S, 50 $^{\circ}$ C/30 S, 72 $^{\circ}$ C /30 S; 72  $^{\circ}$ C /10 min (Figura 4). Al final se añadirá un tiempo de extensión de 5 min, para permitir que se adicione al extremo 3'-OH Para analizar la amplificación del producto de PCR, se realizará una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 V constantes por 50 min. El gel de agarosa será teñido con bromuro de etidio durante 15 min y revelado con luz ultravioleta en el transluminador (UVP, Transilluminator).



**Figura 4.** Esquema de temperaturas para la amplificación de 766 pb del gen 7.

#### 5.14 Clonación del gen de matriz que codifica para la proteína de matriz

La clonación del producto de PCR de 766 pb del gen 7 del virus Influenza que codifica para la proteína M1 se realizó con el plásmido pGEM-T mediante el Kit de Clonación pGEM-T Vector System (Promega). El producto de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa LowMealting 1.5% a 100 V constantes por 1 hora, seguida de una tinción con bromuro de etidio por 15 min. Utilizando una lámpara de luz ultravioleta (UVP, Transilluminator) con baja intensidad se cortó el fragmento con la banda de interés, estos fragmentos se depositaron en un tubo de centrifuga y se purificaron utilizando el Kit WizardRSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

#### **5.14 Ligación del producto de PCR al plásmido pGEM-T**

Se realizó en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL, para una reacción se mezclaron: 5.0µL de solución amortiguadora T4 DNA Ligasa 2X (Promega), 0.5µL de plásmido pGEM-T (50ng/ µL), 3.0µL de producto de PCR purificado, 1.0 µL de enzima T4 DNA Ligasa 3 U/ µL y 0.5 µL agua nanopura estéril para obtener un volumen final de 10.0 µL. Los tubos se incubaron a 4°C toda la noche, como lo especifica el kit de clonación pGEM-T and PGEM-T EasyVectors (promega).

#### **5.15 Transformación de E.coli DH5α competentes.**

Se mezclaron 100 µL de bacterias y 10 µL de la reacción de ligación en un tubo de centrifuga. Se agito suavemente el tubo y se incubo en hielo durante 30 min. El tubo se introdujo en baño de agua previamente calentado a 42°C por 90 S inmediatamente el tubo se volvió a incubar en hielo por 2 min. Se adicionaron 450 µL de medio de cultivo SOC (atemperado a 37°C). Se transfirió a un tubo de ensaye estéril de 13X100. Las bacterias se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante 1 hora. Posteriormente el cultivo de bacterias se regresó al tubo de micro centrifuga donde se realizó el shock térmico y se centrifugo un instante a 10,000 rpm. Se retiró el medio de cultivo y el pellet de bacterias fue resuspendido en 50 µL de medio de cultivo SOC. Los 50 µL de bacterias transformadas fueron inoculadas por el método de dispersión en placa en una caja de Agar LB adicionado con Ampicilina (50 µL/mL) con un asa triangular. Las cajas se incubaran a 37°C por 12 hrs.

#### **5.16 Purificación de plásmidos de bacterias transformadas**

Se inocularon las colonias de bacterias en tubos de ensaye de 13X100 con 3 mL de Caldo LB/Ampicilina (50 µg/mL) utilizando palillos de madera estéril. Estos tubos se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm por toda la noche. Posteriormente en condiciones de esterilidad se tomaron 2 mL de cultivo de bacterias y se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron a 8,000 rpm por 5 min y se retiro

el medio de cultivo. La purificación de plásmidos se realizó a partir del pellet de bacterias utilizando el método tradicional de lisis alcalina y el Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) para su secuenciación.

### **5.17 Análisis de plásmidos purificados**

En condiciones de esterilidad se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron por 2 min a 14,000 rpm, posteriormente se retiró todo el sobrenadante del pellet. El pellet fue suspendido en 300 µL del buffer TE pH 8, el cual fue incubado por 3 minutos a temperatura ambiente, después se agregaron 300 µL de la solución desnaturalizante mezclando por inversión 6 veces con un periodo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 300 µL de acetato de potasio 5.5 M de manera enérgica con la micropipeta, inmediatamente se incubó por 10 minutos en hielo. Una vez transcurridos los 10 min se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante del tubo y fue dividido en 2 tubos de microcentrifuga de 1.5 mL (400 µL aproximadamente), una vez dividido el sobrenadante se añadió 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión 6 veces y se incubó a -20 °C por 20 minutos, después se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante por decantación sobre papel absorbente. Se agregaron 500 µL de etanol al 75% y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, de igual forma se retiró el sobrenadante en papel absorbente y se dejaron los tubos secando a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar por 20 minutos. Una vez formada la pastilla se suspendió en 25 µL de agua mili Q. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.0%, a 100 V constantes por 50 min. El gel será teñido con bromuro de etidio por 15 min y se revelará con luz ultravioleta (UVP, Transilluminator).

Para confirmar la presencia del inserto (766 pb) en los plásmidos purificados, se realizó un análisis mediante PCR y/o una reacción de restricción con las enzimas BamH I y Sal I. En el análisis por PCR se utilizaron los oligonucleótidos que se usaron para amplificar cada producto de PCR originalmente. La mezcla de reactivos para una reacción se realizó en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL conteniendo 1.0 µL de plásmido purificado, 1.25 µL de Buffer NH<sub>4</sub> 10X (Bioline), 0.37 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.25 µL de cada

oligonucleótido a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  cada uno, 2.0  $\mu\text{L}$  de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5mM cada uno, 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima DNA polimerasa 500 U/ $\mu\text{L}$  (Bioline) y 6.88  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 12.5  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reactivos se colocará en un termociclador (TERMOHYBAID PCR sprint), utilizándose el mismo programa de amplificación de los productos de PCR. En seguida se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 100 V constantes por 50 min. El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 min y se reveló con lámpara de luz ultravioleta (UVP, Translluminator).

Para realizar el análisis de restricción, los plásmidos se mezclaron con las enzimas de restricción BamH I y Sal I simultáneamente. La mezcla de reactivos para una reacción se llevo a cabo en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL utilizando 0.5  $\mu\text{L}$  del solución amortiguadora REACT 3 10X de la enzima BamH I (Invitrogen), 7.0  $\mu\text{L}$  de plásmido purificado, 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima BamH I 10 U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen), 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima Sal I 10 U/ $\mu\text{L}$  (Promega) y 1.5  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reactivos se incubo a 37°C por 1.5 hrs y posteriormente, se realizo una electroforesis en gel de agarosa 1.5%, a 100 V constantes por 50 min. El gel se tiño con bromuro de etidio por 15 min y se reveló con luz ultravioleta (UVP, Translluminator).

### **5.18 Secuenciación del gen de matriz.**

Para confirmar la presencia asegurar la presencia de la secuencia de nucleótidos del gen 7 (1-766nt), se realizó a partir de la construcción del plásmido pGEM-T/PCR-M1. Las clonas de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pGEM-T/PCR-M1 se inocularon en tubos de ensaye de 13X100 con 3 mL de caldo LB/Ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm toda la noche. Posteriormente se purificaron los plásmidos a partir de todo el cultivo de bacterias (3 mL), utilizando el Kit WizardR Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem (Promega). Después se realizó una electroforesis de los plásmidos en gel de agarosa 1%, a 100 V constantes por 1 hora, para verificar la integridad y cantidad de los plásmidos purificados. Posteriormente se prepararo 1 mL de

una dilución 1:200 de cada plásmido en agua nanopuraesteril (libre de sales) y se medirá la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta.

La concentración final de ADN para enviar a secuenciar se ajustó a 750 ng/μL en agua nanopura estéril. La secuencia de nucleótidos se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, utilizando el secuenciador Perkin Elmer/AppliedBiosystems Modelo 3730 utilizando mediante el método basado en fluorescencia Taq FS Dye Terminador.

### **5.19 Análisis de secuencia de ADN.**

La secuencia de nucleótidos de las cepas de campo, primero se analizaron utilizando el software BLAST nucleotide (NCBI) para comprobar que el gen pertenecía al virus Influenza aviar. En seguida, se elaboró una comparación de la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos utilizando el programa CLUSTAL W / BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0 (Hall, 1999). Todas las secuencias de nucleótidos/aminoácidos obtenidas de las cepas del virus Influenza aviar, serán depositadas en el Nucleotide Sequence Database (GenBank).

### **5.20 Subclonación**

#### **5.20.1 Preparación del inserto y plásmido de expresión**

Los plásmidos pGEM-T fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción BamH I y Sal I, para esto los plásmidos se purificaron y de cada plásmido pGEM-T y pET-28a (+) con inserto se realizaron 2 reacciones de restricción. La mezcla de reactivos se realizará en tubos de microcentrifuga de 0.6 mL utilizando el mismo protocolo previamente descrito para el análisis de plásmidos purificado. La mezcla de reactivos se incubó a 37°C por 1.5 hrs y posteriormente se hizo una electroforesis de todo el volumen de reacción de restricción en gel de agarosa 1.5 % LOW MEALTING a 100 V constantes por 1 hora. El gel se tiñó con bromuro de etidio por 15 min y utilizando una lámpara UV (UVP, Transilluminator) con intensidad baja se procedió a cortar el fragmento de gel con el



fragmento liberado del plásmido pGEM-T. Los fragmentos del gel se depositaron en un tubo de microcentrifuga y se purificaron con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). El plásmido pET-28a (+) digerido, se sometió a una electroforesis en gel de agarosa 1.5 % LOW MEALTING para realizar una purificación a partir de gel. Los insertos y plásmidos purificados fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

### **5.21 Ligación del producto de PCR y plásmido pET-28a (+)**

Se mezcló en un tubo de centrifuga de 0.2 mL, 1.0 µL de Solución amortiguadora T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen), 3.0 µL de inserto-PCR, 1.0 µL de plásmido pET-28a (+) linealizado (50 ng/ µL), 1.0 µL de enzima T4 DNA Ligasa 10U/ µL (Invitrogen) y 4.0 V de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0 µL. La reacción de ligación se incubó a 4°C toda la noche.

### **5.22 Transformación de E.coli BL 21 competentes**

Se transformaron utilizando el protocolo previamente descrito utilizando los 10 µL de reacción de ligación. Las bacterias transformadas se inocularon en una caja de Agar LB/Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 12 hrs. Se purificaron los plásmidos de las clonas de bacterias de E. coli DH5α transformadas utilizando el Kit Wizard Plus SV Minipeps DNA System (Promega) y mediante una reacción de restricción y/o PCR se analizó la presencia de inserto-PCR utilizando la metodología.

### **5.23 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes**

Tres asadas del cultivo de bacterias BL21 (DE3) transformadas se inocularon en tubos de ensayo 13X100 con 3 mL de caldo LB/Kanamicina (50 µg/mL), y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante la noche. Posteriormente, se inocularon 120 mL de caldo LB (sin antibiótico) con 1.2 mL de cultivo de bacterias durante toda la noche, realizando una dilución 1:100, las bacterias se mantuvieron en agitación a 250 rpm a

37°C por 2 horas. Al terminar este tiempo se monitoreo la densidad óptica del cultivo y se tomó una alícuota de 1 mL para medir la absorbancia de 590 nm. El matraz continuó en agitación constante hasta que la densidad óptica alcanzo entre 0.4-0.6 de absorbancia. Cuando el cultivo presento la densidad requerida, se suspendió la incubación un instante para tomar una alícuota de 10 mL de cultivo, el cual se utilizó como control de bacterias no inducidas, esta alícuota permaneció almacenada a 4°C. Al resto del cultivo se le adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína M1 recombinante. Se continuó con la incubación a 37°C con agitación de 250 rpm por 5 horas. Las bacterias inducidas y las no inducidas se transfirieron a tubos conicos de 50 mL y se centrifugaron a 5,000 rpm a 4°C por 10 minutos. El caldo LB se decantó y el pellet de bacterias se pesó para resuspender las bacterias en el buffer B1. Por cada gramo de pellet de bacterias, se adicionó 10 mL de buffer. Las bacterias resuspendidas se almacenaron a 20°C hasta su uso.

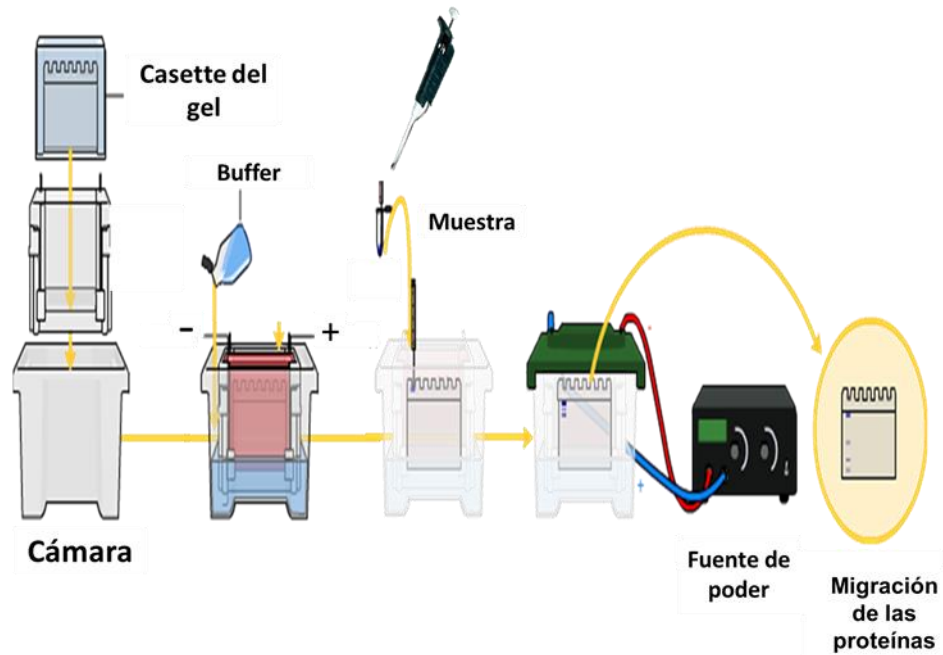
#### **5.24 Lisis bacteriana**

La proteína M1 recombinante en las bacterias BL21 (DE3) son producidas en el citoplasma, por lo cual, se realizó un análisis de las bacterias en dos etapas. Primero se utilizó una lisozima de clara de huevo (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.2 mg/mL, agitándose por 30 minutos a temperatura ambiente. El extracto de las bacterias se dispensó en alícuotas de 1 mL en tubos de centrifuga de 1.5 mL. Para realizar una lisis mecánica se utilizó un sonicador durante 15 minutos. Para disolver los posibles cuerpos de inclusión que se forman por una alta producción de proteínas recombinantes que impiden que se solubilice la proteína se adicionó al extracto de bacterias urea a una concentración final de 8 M. Los extractos de las bacterias se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

## **5.25 Análisis de Proteínas recombinantes**

### **5.25.1 Purificación de proteínas recombinantes**

Se realizó mediante una cromatografía de afinidad utilizando las columnas de purificación HisTrap FF Crude (GE Healthcare), debido a que las proteínas recombinantes presentaron 6 Histidinas en tándem en el extremo amino. La cromatografía se realizó bajo condiciones desnaturalizantes por lo que los reactivos utilizados contenían urea a una concentración final de 4M. Para realizar la cromatografía, primero se lavó una columna nueva con 20 mL de agua bidestilada para eliminar el etanol 20% (solución de almacenaje); después se adicionaron 10 mL de solución amortiguadora B2 para equilibrar la columna. Posteriormente se pasaron todo el volumen de extracto de bacterias lisadas previamente ajustado a un pH de 7.4. Se colocara todo el eluente para posteriores purificaciones. En seguida se realizó un lavado con 20 mL de solución amortiguadora B3 para eliminar la unión inespecífica de proteínas bacterianas y después se adicionaron 5 mL de solución amortiguadora de elución colectándose 5 fracciones cromatografías de 1 mL cada una en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Por último se aplicó 10 mL de solución amortiguadora B2 para lavar y equilibrar la columna. Las fracciones cromatografías y las columnas de afinidad fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. Posteriormente se realizó un SDS-PAGE para determinar la sobre expresión de la proteína recombinante M1 del virus influenza (Figura 5).



**Figura 5.** Diagrama de preparación de la cámara de electroforesis.

### **5.26 Esquema de inmunización de los conejos y cabras con las proteínas recombinantes de la proteína de matriz M1 del virus influenza**

Se obtuvo sangre de conejos y cabras antes de iniciar la inmunización y el suero fue analizado por ELISA indirecto para la determinación de los títulos de trabajo. Después del análisis, se inició la inmunización de la siguiente manera: 3 inoculaciones vía intradérmica y en 6 puntos diferentes con intervalo de 15 días, la primera con Adyuvante completo de Freud (FAC) y las siguientes con Adyuvante incompleto Freud (FAI). El inóculo fue de un volumen final de 1 mL; 0.5 mL de adyuvante correspondiente y 0.5 mL de la fracción del péptido recombinante. Después de estas inoculaciones el suero se analizó por ELISA y se inoculó una vez más a los conejos y cabras. Se realizó el sangrado final a los 11 días.

Para la obtención de sangre de los conejos se colocaron en una caja inmovilizadora de conejos, se desinfectaron las orejas con alcohol 70 %, posteriormente se obtuvieron la sangre de la vena central de las orejas usando jeringas de 22 Gauges y volumen variable.

La sangre obtenida se colectaron en tubos sin anticoagulante, se dejaron reposar hasta que las fases se separen, se centrifugará a 10,000 rpm 10 min a 4°C y por último, se guardó una alícuota a 4°C y el resto a -20°C. El volumen de sangre que se obtuvieron en las tomas fueron alrededor de 3 mL excepto en el sangrado final que será de 25 mL.

### **5.27 Análisis de Anticuerpos policlonales**

Para evaluar la reactividad de los anticuerpos policlonales contra la proteína de matriz recombinante se realizaron los siguientes ensayos:

### **5.28 Ensayo de ELISA indirecto para la titulación de los sueros anti M1 recombinante producidos en cabra y conejo.**

En placas de 96 pozos se sensibilizaron con 75 µL de proteína M1 recombinante a una concentración de 40 µg/µL diluida en una solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato pH 9.6 las cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Se realizaron 2 lavados con Solución amortiguadora Salino de Fosfatos (PBS)-Tween 20 0.1%, las placas se bloquearon con una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% a 37°C durante 1.5 hrs. Después de 4 lavados con PBS-Tween 0.1 %, se le adiciono una suspensión de anticuerpos anti M1 recombinante de 0, 15, y 30 días y se incubo a 37° C durante 1hrs. Posterior a 4 lavados se adicionará 75 µL de Proteína A-Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2,500 y se incubara a 37°C por 40 min. Se retirará la proteína A-HRP, se lavará 4 veces y se adicionará 50 µl de sustrato ABTS (Zymed).Se incubará a 37°C por 20min, para detener la reacción colorimétrica se añadieron 50 µL de SDS al 1%. La reacción colorimétrica será medida en un lector de ELISA (Digital and AnalogSystems S.R.L modelo A2) a una absorbancia de 450 nm. El criterio para determinar el título de trabajo para realizar las ELISAS para la detección de anticuerpos, será cuando la absorbancia sea 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo.

### **5.29 Western-blot**

Para identificar que los péptidos recombinantes mantienen sus características antigénicas, se realizó un ensayo de Western-blot utilizando anticuerpos anti-Hn producido en conejo. Los péptidos recombinantes fueron sometidos a una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en geles discontinuo de poliacrilamida (gel concentrador 4%; gel separador al 12%) utilizando las mismas condiciones de electroforesis anteriormente mencionadas. Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (Sigma-Aldrich) a 60 V constantes por 1.5 hrs. Al terminar este tiempo, la membrana de nitrocelulosa se lavó rápidamente con agua nanopura y se dejó toda la noche en una solución bloqueadora de leche descremada 5 % PBS a temperatura ambiente. Después la membrana se lavaron dos veces con PBS-leche descremada 0.1 % por espacio de 10 min cada lavado. En seguida se adiciono el anticuerpo anti-M1 diluido 1:3,000 y se incubo a 37°C por 1.5 hrs con agitación constante. Se retiró el anticuerpo y se lavara 3 veces con PBS-leche descremada 0.1 %. Se adiciono proteína A unida a peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2, 000 y se posteriormente se incubo a 37°C por 1.5 hrs con agitación constante. La membrana se lavó 3 veces y después se adicionará 1 mL de sustrato TMB (Sigma Aldrich) mezclando suavemente hasta ver la aparición de las bandas positivas de color azul. La reacción se detuvo lavando la membrana con agua destilada.

### **5.30 Ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza tipo A en humanos**

Para la determinación de un suero positivo para los ensayos de Elisa se utilizó el kit Influenza Virus A IgG (DGR<sup>®</sup>) de la siguiente manera:

Se diluyeron los sueros en una dilución 1:2000 en la solución diluyente colocando 100uL en el pozo correspondiente así como 100uL de cada control, una vez cargado la muestra se procedió a incubar durante 60 min a 37 °C. Posteriormente se retiraron las muestras y los controles con la solución de lavado, para agregar 100uL del conjugado en cada pozo y se incubo a 37°C por 30 min. Se retiró el conjugado realizando 5 lavados. Se adiciono a

cada pozo 100 uL del sustrato incubando a 37 °C por 15 min. Una vez concluido este tiempo se detuvo la reacción con 100 uL de la solución stop. La reacción colorimétrica será medida en un lector de ELISA (Digital and Analog Systems S.R.L modelo A2) a una absorbancia de 450 nm.

### **5.31 Ensayo de ELISA tipo HADAS para la detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza tipo A**

En placas de 96 pozos se sensibilizaron con 75 µL de sueros o sangre de aves migratorias o residentes a una dilución 1:10 y 11:1 respectivamente diluidos en una solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato pH 9.6 las cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Se realizaron 4 lavados con solución amortiguadora PBS-Tween 20 0.1%, las placas se bloquearon con una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% a 37°C durante 1hr. Después de 3 lavados con PBS-Tween 0.1 %, se le adicione una suspensión 75 µL de proteína M1 recombinante a una concentración de 40 µg/µL diluida en una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% y se incubo a 37° C durante 1hrs. Posterior a3 lavados se adicionará 75 µL de anticuerpos policlonales anti M1 recombinante producidos en conejo diluida 1:7,000 en una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% y se incubara a 37°C por 1 hr. Después de 3 lavados con PBS-Tween 0.1 %, se le adicione una suspensión 75 µL Proteína A-Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2,500 y se incubara a 37 °C por una hora. Se retirará la proteína A-HRP, se lavará 4 veces y se adicionará 50 µl de sustrato ABTS (Zymed).Se incubará a 37°C por 20min, para detener la reacción colorimétrica se añadieron 50 µL de SDS al 1%. La reacción colorimétrica será medida en un lector de ELISA (Digital and Analog Systems S.R.L modelo A2) a una absorbancia de 450 nm. El criterio para determinar el título de trabajo para realizar las ELISAS para la detección de anticuerpos, será cuando la absorbancia sea 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo

### **5.32 Ensayo de ELISA tipo HADAS para la detección de variantes antigénicas en la proteína M1**

En placas de 96 pozos se sensibilizaron con 75  $\mu$ L de sueros o sangre de aves migratorias o residentes que fueron positivos para la proteína M1 de la cepa con epítopes comunes a una dilución 1:10 y 11:1 respectivamente diluidos en una solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato pH 9.6 las cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Se realizaron 4 lavados con solución amortiguadora PBS-Tween 20 0.1%, las placas se bloquearon con una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% a 37°C durante 1hr. Después de 3 lavados con PBS-Tween 0.1 %, se le adiciono una suspensión 75  $\mu$ L de proteína M1 recombinante a una concentración de 40  $\mu$ g/ $\mu$ L diluida en una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% y se incubo a 37° C durante 1hrs. Posterior a 3 lavados se adicionará 75  $\mu$ L de anticuerpos policlonales anti M1 recombinante producidos en conejo diluida 1:7,000 en una solución de leche descremada 5 % en PBS-Tween 0.1% y se incubara a 37°C por 1 hr. Después de 3 lavados con PBS-Tween 0.1 %, se le adiciono una suspensión 75  $\mu$ L Proteína A-Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2,500 y se incubara a 37 °C por una hora. Se retirará la proteína A-HRP, se lavará 4 veces y se adicionará 50  $\mu$ l de sustrato ABTS (Zymed).Se incubará a 37°C por 20min, para detener la reacción colorimétrica se añadieron 50  $\mu$ L de SDS al 1%. La reacción colorimétrica será medida en un lector de ELISA (Digital and Analog Systems S.R.L modelo A2) a una absorbancia de 450 nm. El criterio para determinar el título de trabajo para realizar las ELISAS para la detección de anticuerpos, será cuando la absorbancia sea 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo

### **5.33 Análisis estadísticos de los resultados:**

#### **5.33.1 Grafico de tipo ROC para el ensayo de Elisa tipo HADAS para la detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza tipo A.**

Se eligieron al azar 200 muestras analizadas, las cuales fueron clasificadas en un código binario, identificando con un 0 las muestras negativas y con el numero 1 las muestras



positivas, según el punto de corte determinado al comparar la absorbancia del control negativo (suero fetal bovino), obteniendo el gráfico de tipo ROC utilizando el software MedCalc.

### **5.33. 2 Análisis de diferencias entre el control positivo con los dos antígenos.**

Las variables fueron analizadas mediante el programa de análisis estadístico SPSS versión 17.0 (SPSS Inc.; Chicago IL, EUA), mediante una diferencia de medias por un análisis de ANOVA ONE WAY, así como determinar un gráfico de error para ver cómo se distribuyó la población analizada.

## 6. RESULTADOS

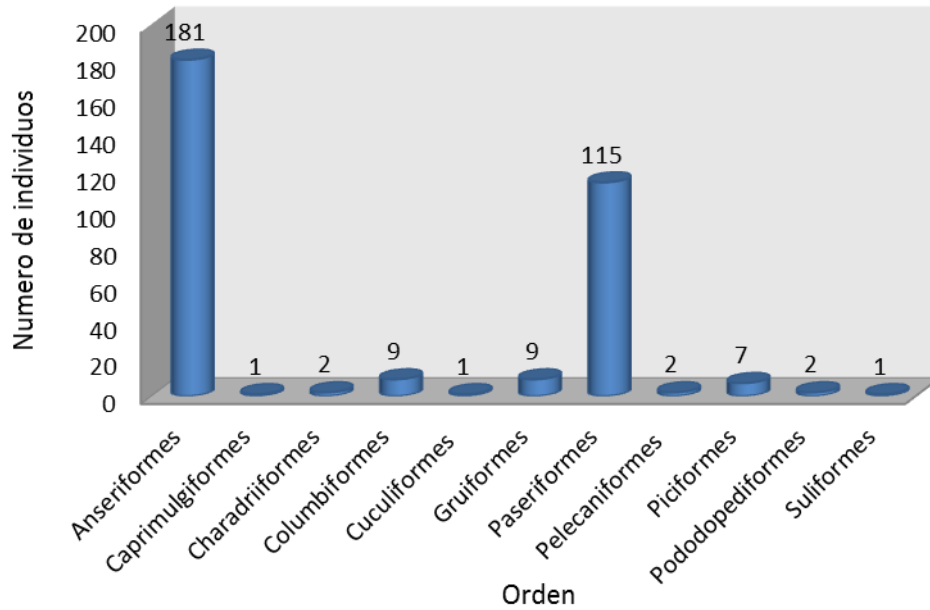
Este estudio fue enfocado a determinar si las variaciones en la proteína de matriz M1 del virus influenza tipo A influyen a nivel antigénico. El objetivo fue evaluar el efecto que ejercen los cambios a niveles genéticos sobre los antigénicos a nivel de proteína, además de evaluar si esos pequeños cambios podrían influir para que las diferentes cepas del virus escapen a un diagnóstico oportuno. Para lograr este objetivo se utilizó una colección de muestras de heces y sueros proporcionada por el laboratorio de biología de la conservación de un periodo de colecta comprendido del 2010 al 2012 en 5 estados de la república Mexicana durante las temporadas de invernación, migración y reproducción.

### 6.1 Distribución ecológica de especies en población colectada:

#### 6.1.1 Muestras de heces

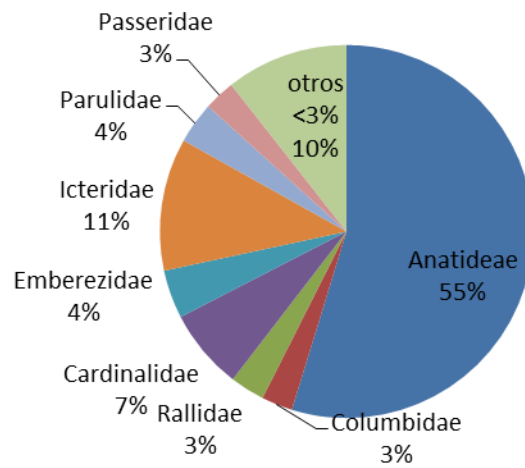
Las 330 muestras de heces analizadas pertenecen a los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Yucatán. Las muestras fueron tomadas de aves de 11 órdenes entre los cuales el orden *Anseriformes* se encuentra en mayoría con 181 (55%) individuos, seguido por el orden *Passeriformes* con 115 (35%), después por los órdenes *Columbiformes*, *Gruiformes*, *Piciformes*, *Charadriiformes*, *Pelecaniformes*, *Podicipediformes*, *Caprimulgiformes*, *Cuculiformes* y *Suliformes* con menos de 9 individuos (Figura 6). Dentro de los órdenes se ubicaron 23 familias de las cuales la familia *Anatidae* presenta un mayor número de individuos seguida en orden de más a menos por las familias *Icteridae*, *Cardinalidae*, *Emberezidae*, *Parulidae*, *Columbidae*, *Rallidae*, *Passeridae*, *Mimidae*, *Picidae*, *Tyrannidae*, *Poliopitidae*, *Podicipedidae*, *Caprimulgidae*, *Haematopodidae*, *Laridae*, *Cuculidae*, *Troglodytidae*, *Turidae*, *Vireonidae*, *Ardeidae*, *Threskiornithidae* y *Palacrocoracidae* (Figura 7). Entre las diferentes familias identificadas se logró identificar un total de 66 especies como se muestra en la tabla 1 destacando con 125 individuos el *Anasdiscors*, seguido con 16 *Anascrecca* ambos

pertenecientes al mismo orden y familia *Anseriformes* y *Anatidae* respectivamente y en tercer lugar *Molothrusater* el cual pertenece la familia *Icteridae* del orden *Passeriformes*.



**Figura 6.** Distribución de individuos por orden de muestras de heces colectadas durante el 2010-2012 en 4 estados de México.

## Individuos por Familia

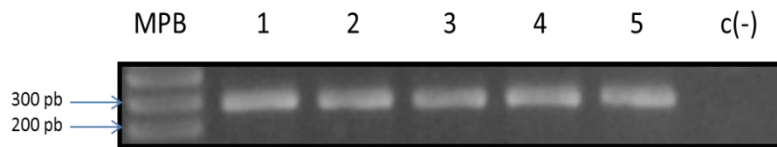


**Figura 7.** Distribución de individuos por familias de muestras de heces colectadas durante el 2010-2012 en 4 estados de México.

Tabla 1. Distribución ecológica de las diferentes especies con muestras de heces colectadas					
ORDEN	FAMILIA	ESPECIE	INDIVIDUOS		
Anseriformes	Anatideae	<i>Anas acuta</i>	8		
		<i>Anas crecca</i>	16		
		<i>Anas americana</i>	3		
		<i>Anas clypeata</i>	7		
		<i>Anas discors</i>	125		
		<i>Anas platyrhynchos</i>	3		
		<i>Anas strepera</i>	4		
		<i>Anser albifrons</i>	2		
		<i>Aythya affinis</i>	2		
		<i>Bucephala albeola</i>	3		
<i>Oxyura jamaicensis</i>	8				
Caprimulgiformes	Caprimulgidae	<i>Chordeiles acutipennis</i>	1		
Charadriiformes	Haematopodidae	<i>Haematopus palliatus</i>	1		
	Laridae	<i>Larus delawarensis</i>	1		
Columbiformes	Columbidae	<i>Columbina inca</i>	1		
		<i>Columbina passerina</i>	2		
		<i>Columba livia</i>	1		
		<i>Zenaida asiatica</i>	3		
		<i>Zenaida macroura</i>	1		
		<i>Patagioenas flavirostris</i>	1		
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	1		
Gruiformes	Rallidae	<i>Fulica americana</i>	9		
Paseriformes	Cardinalidae	<i>Cardinalis cardinalis</i>	9		
		<i>Cardinalis sinatus</i>	9		
		<i>Paserina ciris</i>	5		
	Emberezidae	<i>Aimophila cassinii</i>	1		
		<i>Amphispiza bilinata</i>	1		
		<i>Ammodramus savannarum</i>	1		
		<i>Arremonops rufivirgatus</i>	1		
		<i>Chondestes grammacus</i>	2		
		<i>Melospiza lincolni</i>	1		
		<i>Piranga rubra</i>	1		
		<i>Spizella pallida</i>	3		
		<i>Zonotrichia leucophrys</i>	3		
		Paseriformes	Icteridae	<i>Agelaius phoeniceus</i>	6
				<i>Euphagus cyanocephalus</i>	2
<i>Icterus cuculatus</i>	4				
<i>Icterus bullockii</i>	2				
<i>Icterus gularis</i>	2				
<i>Molothrus aeneus</i>	5				
<i>Molothrus ater</i>	14				
<i>Quiscalus mexicanus</i>	3				
Mimidae	<i>Mimus polyglottos</i>		5		
	<i>Toxostoma curvirostre</i>		2		
	<i>Toxostoma longirostre</i>		1		
Parulidae	<i>Cardellina pusilla</i>		1		
	<i>Dendroica coronata</i>		2		
	<i>Icteria virens</i>		5		
	<i>Geothlypis trichas</i>		3		
Passeridae	<i>Vermivora ruficapilla</i>		1		
Poliophtilidae	<i>Passer domesticus</i>		9		
	<i>Poliophtila caerulea</i>		1		
	<i>Poliophtila albiloris</i>		1		
Troglodytidae	<i>Thryomanes bewikii</i>		1		
Turidae	<i>Catharus guttatus</i>	1			
	<i>Empidonax sp.</i>	2			
Tyrannidae	<i>Myiarchus tyrannulus</i>	2			
	<i>Tyrannus forficatus</i>	2			
Vireonidae	<i>Vireo solitarius</i>	1			
Pelecaniformes	Ardeidae	<i>Ardea alba</i>	1		
	Threskiornithidae	<i>Eudocimus albus</i>	1		
Piciformes	Picidae	<i>Melanerpes auriformis</i>	6		
		<i>Picoides scalaris</i>	1		
Pododopediformes	Podicipedidae	<i>Podilymbus podiceps</i>	1		
		<i>Podiceps nigricollis</i>	1		
Suliformes	Palacrocoracidae	<i>Phalacrocorax auritus</i>	1		

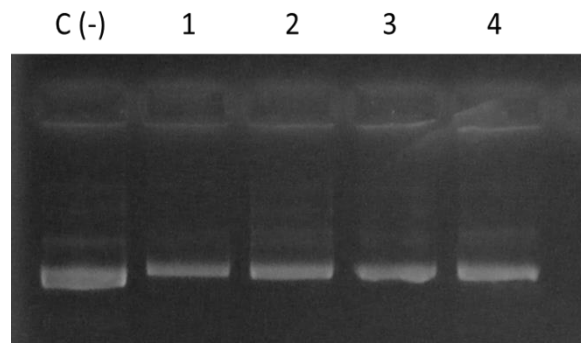
## 6.2 Detección molecular del virus influenza tipo A en aves migratorias y residentes de México

Para la identificación del virus influenza se obtuvo el RNA total de 10 muestras de heces y 2 muestras humanas como control positivo, empleando el método combinado de dos métodos comerciales; TRIZOL reagent y el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®). El RNA fue sometido a una RT-PCR para amplificar una región del gen del virus influenza. Se emplearon los oligonucleótidos de identificación del tipo AM30F2/08 y M264R3/08 recomendados por la OMS, obteniéndose un producto de PCR de 244pb bajo las condiciones anteriormente mencionadas (Figura 8).



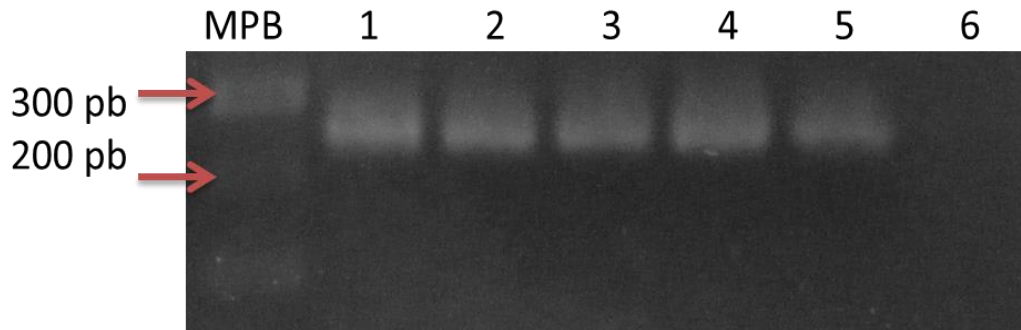
**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de productos de PCR de la región de 264 pb del gen 7.

Una vez obtenido el producto de 244pb fue purificado y clonado en el plásmido de pGEM-T utilizando bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio competentes para determinar si la banda obtenida corresponde al fragmento del gen 7 flanqueado por los oligonucleótidos recomendados por la OMS para la detección del virus influenza tipo A (Figura 9).



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa 1 % de plásmido pGEM-T con insertos de 244pb. C (-); Plásmido sin inserto; carril 1: Clona 1 cepa aviar BM21; carril 2: Clona 2 cepa aviar BM21; carril 3: Clona 1 cepa aviar BM25; carril 4: Clona 2 cepa aviar BM25

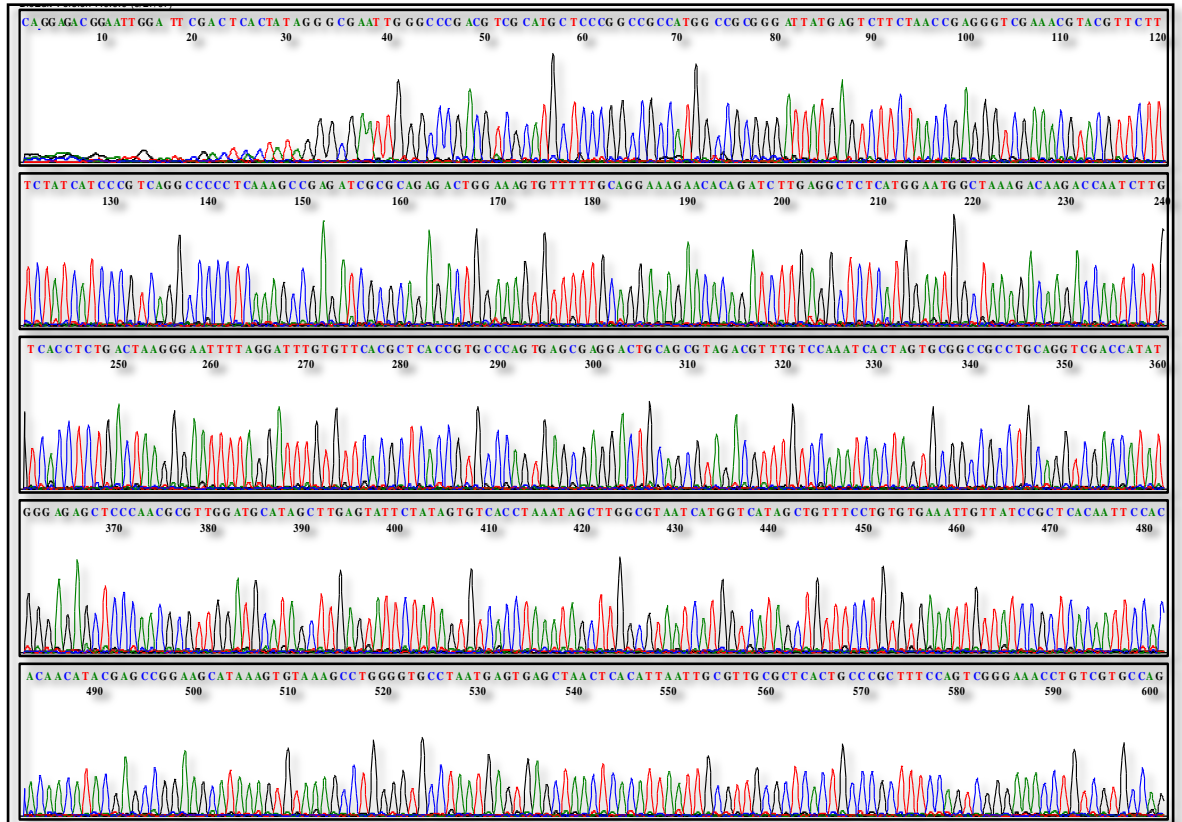
Se procedió a analizar mediante PCR los plásmidos que presentaron menor migración que el plásmido sin inserto, para verificar la presencia del inserto (Figura 10.)



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de PCR de confirmación a partir plásmido pGEM-T con insertos de 244pb. Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder IV. Carril 1: Producto de PCR muestra BM25; carril 2: Clona 1 cepa aviar BM21; carril 3: Clona 2 cepa aviar BM21; carril 4: Clona 1 cepa aviar BM25; carril 5: Clona 2 cepa aviar BM25; carril 6: Plásmido sin inserto.

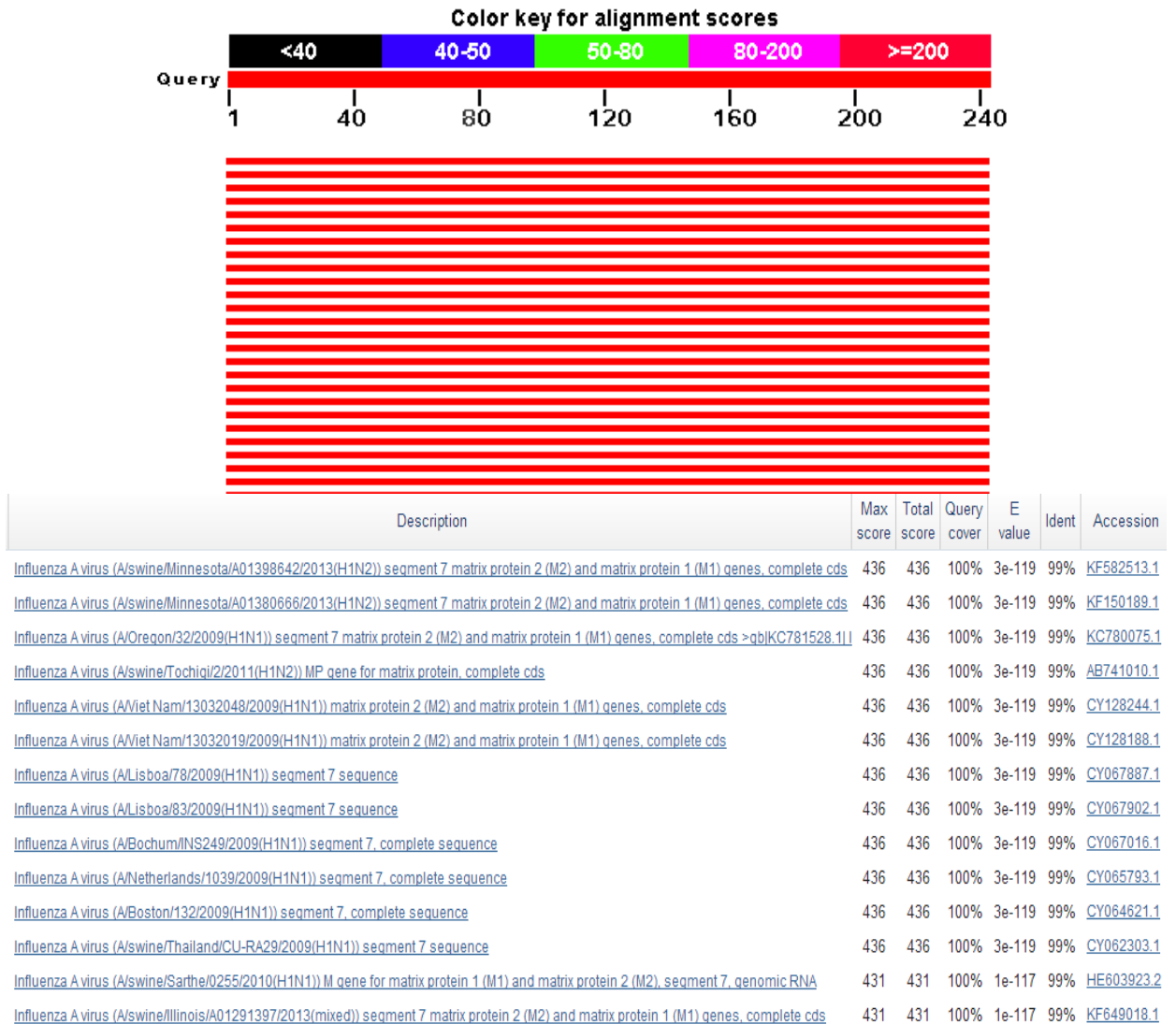
### **6.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 244 pb del gen 7 del virus influenza tipo A en aves silvestres.**

La secuencia de nucleótidos del producto de PCR (244 pb) se obtuvo a partir del Cromatograma obtenido mediante el método de piro secuenciación (Figura 11) la cual fue analizada empleando el software Bioedit V7.0/ Clustal W. Posteriormente se empleó la herramienta BLAST nucleotide (NCBI) para determinar la identidad de la secuencia obtenida. (Figura 12).



**Figura 11.** Cromatograma de la secuencia de 264 pb en el plásmido pGEMT-T/M1 de la cepa aviar Bm21.





**Figura 12.** Gráfico de identidad de la región de 244 pb con la base de datos del NCBI.

Una vez confirmada la identidad del virus influenza empleando los cebadores propuestos por la OMS y contando con un control positivo en nuestras muestras se procedió a detectar el virus influenza tipo A en las demás muestras.

Se procedió a extraer el ARN total a partir de 312 muestras de heces las cuales fueron analizadas mediante RTPCR como se describió anteriormente con el control positivo identificando el virus en un 26.9 %. De las muestras positivas un 71.4 % fueron migratorias y un 28.6 % residentes. De estos individuos el 59.5 % pertenecen al orden

*Anseriformes*, seguido con un 34.5 % el *Passeriformes* y después los órdenes *Columbiformes*, *Caprimulgiformes*, *Charadriiformes* y *Pelecaniformes* con menos del 2.3 %. 14 familias se detectaron de entre las cuales un 59.5 % de los individuos son de la familia Anatidae, 13 % Icteridae, 7.1 % Emberizidae, 4.7 % Passeridae y con un porcentaje menor al 2.3 % las familias Caprimulgidae, Cardinalidae, Columbidae, Emberizidae, Icteridae, Laridae, Mimidae, Muscicapidae, Parulidae, Passeridae, Polioptilidae, Threskiornithidae, Tyrannidae. Se detectaron en este grupo de muestras positivas un total de 34 diferentes especies aviares destacando en su mayoría la especie *Anas discors* el cual se encuentra en un 41.66 % del total de individuos.

#### 6.4 Detección de anticuerpos contra el virus influenza en aves silvestres

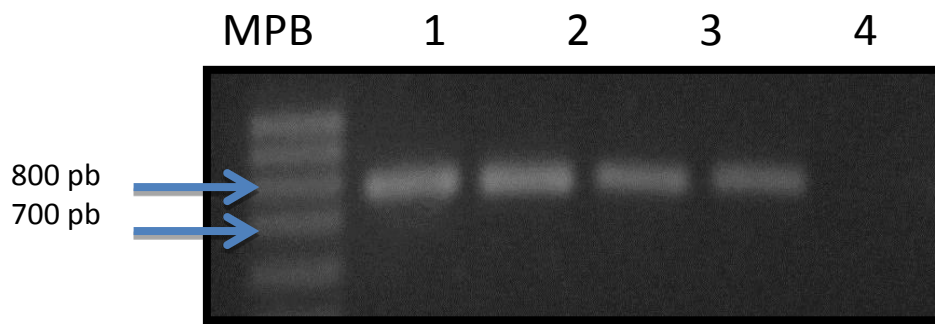
A partir de las 84 muestras positivas la virus influenza tipo A por RTPCR, se seleccionaron al azar 9 muestras de aves y 2 humanas para la secuenciación completa del gen 7 que codifica a la proteína M1 recombinante. Esta proteína se empleara como antígeno en el ensayo de Elisa tipo HADAS para la detección de anticuerpos. De las 7 muestras seleccionadas el 77.7% son aves migratorias pertenecientes al orden *Anseriformes*, mientras que el 22.3% restante son aves residentes de los órdenes *Passeriformes* y *Columbiformes* como se ve en la tabla 2.

**Tabla 2.** Datos generales de las cepas seleccionadas para la secuenciación de la región codificante de M1.

Clave	Fecha de colecta	Estado	Coordenadas	Familia	Genero y especie	Residencialidad
C23	30/01/2010	Tamaulipas	N 26°10'50" W98°55'51"	Anatidae	<i>Anser albifrons</i>	Migratorio
BM2	30/01/2010	Tamaulipas	ND	Anatidae	<i>Anas streperna</i>	Migratorio
BM4	30/01/2010	Tamaulipas	ND	Anatidae	<i>Anas americana</i>	Migratorio
BM5	30/01/2010	Tamaulipas	ND	Anatidae	<i>Anas acuta</i>	Migratorio
V8	09/01/2011	Nuevo León	N 26°10'50" W98°55'51"	Anatidae	<i>Oxyura jamaicensis</i>	Migratorio
A199	10/09/2011	Coahuila	N27°05'11." W101°25'9.8'	Cardinalidae	<i>Cardinalis cardinalis</i>	Residente
A230	10/09/2011	Coahuila	N27°05'11." W101°25'9.8'	Mimidae	<i>Toxostoma longirostre</i>	Residente
Y8	23/01/2011	Yucatán	N 20°59'23.07" W90°20'27.84"	Anatidae	<i>Anas discors</i>	Migratorio
Y10	23/01/2011	Yucatán	N 20°59'23.07" W90°20'27.84"	Anatidae	<i>Anas discors</i>	Migratorio

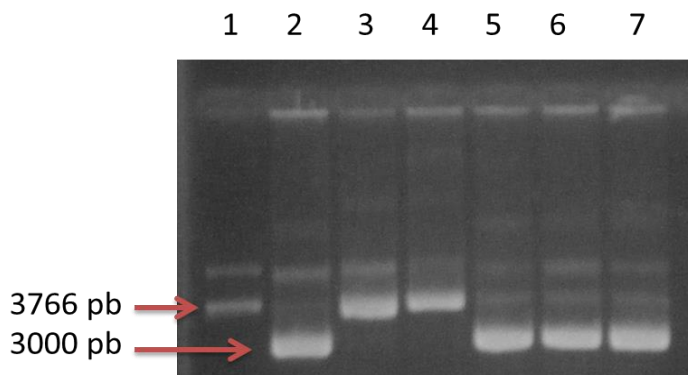
## 6.5 Secuenciación de la región completa de la proteína M1 del virus influenza de aves migratorias y residentes de México

Se les realizó extracción del RNA a las muestras seleccionadas por el método combinado de TRIZOL reagent y el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®). Mediante una reacción de RT-PCR ONE STEP se obtuvo un producto de 766 pb correspondientes al fragmento del gen que codifica para proteína completa de matriz M1 (Figura 13).

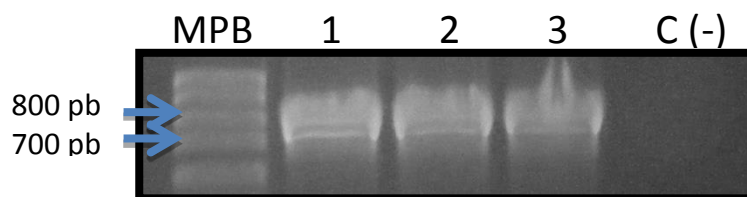


**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de productos de RTPCR purificados para la producción de M1 recombinante del virus influenza tipo A en aves.**  
Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder IV; carril 1: Cepa aviar A199; carril 2: Cepa aviar Bm2; carril 3: Cepa aviar BM4; carril 4: Cepa aviar BM5; carril 5: Control

Una vez purificado el producto de PCR fue ligado en el plásmido pGEM-T y clonado en bacterias de la cepa *E. coli*  $\alpha$ DH5 para su secuenciación y posterior Subclonación en el plásmido de expresión (Figura 14). Posteriormente se realizó una PCR de confirmación del inserto en el pGEM-T (Figura 15). Finalmente se purificaron las clonas que presentaron el inserto de 766 pb para su secuenciación por el método descrito anteriormente en la metodología.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa 1 % de plásmido pGEM-T con insertos de 766 pb. Carril 1 ,3 y 4: Clonas con inserto de 766 pb; carril 2, 5,6 y 7: Clonas de plásmido pGEM-T sin inserto.



**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de productos de PCR de confirmación de la presencia de inserto de 766 pb del gen 7 del virus influenza tipo A en aves. Marcador de pares de base (MPB) HyperLadder IV; carril 1: Clona 1 A199; carril 2: Clona 2 BM4; carril 3: Cepa aviar Clona 3; Control negativo (reactivos con agua miliO).

### 6.6 Análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de matriz M1 del virus influenza.

La secuencia nucleotídica obtenida (766pb) del cromatograma (Figura 16) fue analizada mediante el programa Bioedit V7.0/ Clustal W. Posteriormente se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos (Mega v5.0) y utilizando el programa BLAST protein (NCBI). Se determinó su identidad de las secuencias obtenidas de las 9 cepas con las reportadas en la base de datos del NCBI identificando un porcentaje de homología del 97 al 100% con las secuencias aminoácidas de M1 del virus influenza (Figura 17). El análisis muestra que la secuencia de aminoácidos en su mayoría tiene relación con cepas aisladas en cerdos con subtipo de alta patogenicidad, sin embargo solo la cepa Y8 presento un 100% de homología con la cepa pH1N1 del 2009 y cepas de alta patogenicidad que se

encuentran en la base de datos del National Center of Biotechnology Information como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Porcentaje de identidad de las cepas secuenciadas con las de la base de datos.

Cepa	Hospedero	Identidad NCBI aa
C23	Ganso careto mayor	98-99%
BM2	Pato friso	97-99%
BM4	Pato chalcuán	97-98%
BM5	Pato golondrino	97-98%
V8	Pato tepalcate	97-98%
A199	Cardenal rojo	97-98%
A230	Cuitlacoche pico largo	98-99%
Y8	Cerceta azul	98-99%
Y10	Cerceta azul	99-100%

### 6.7 Análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1

Para la selección de las muestras que serán empleadas para la producción de las proteínas recombinantes se procedió a determinar la relación filogenética entre las secuencias aisladas y con algunas reportadas en el continente americano. Se obtuvo un árbol filogenético empleando el software MEGA 5.05 bajo el algoritmo de Neighbor Joinin Tree para determinar las diferencias en una matriz de distancias donde se determinó la presencia de 10 cambios de aminoácidos en nuestras secuencias ver tabla 4 (Figura 18 y 19).

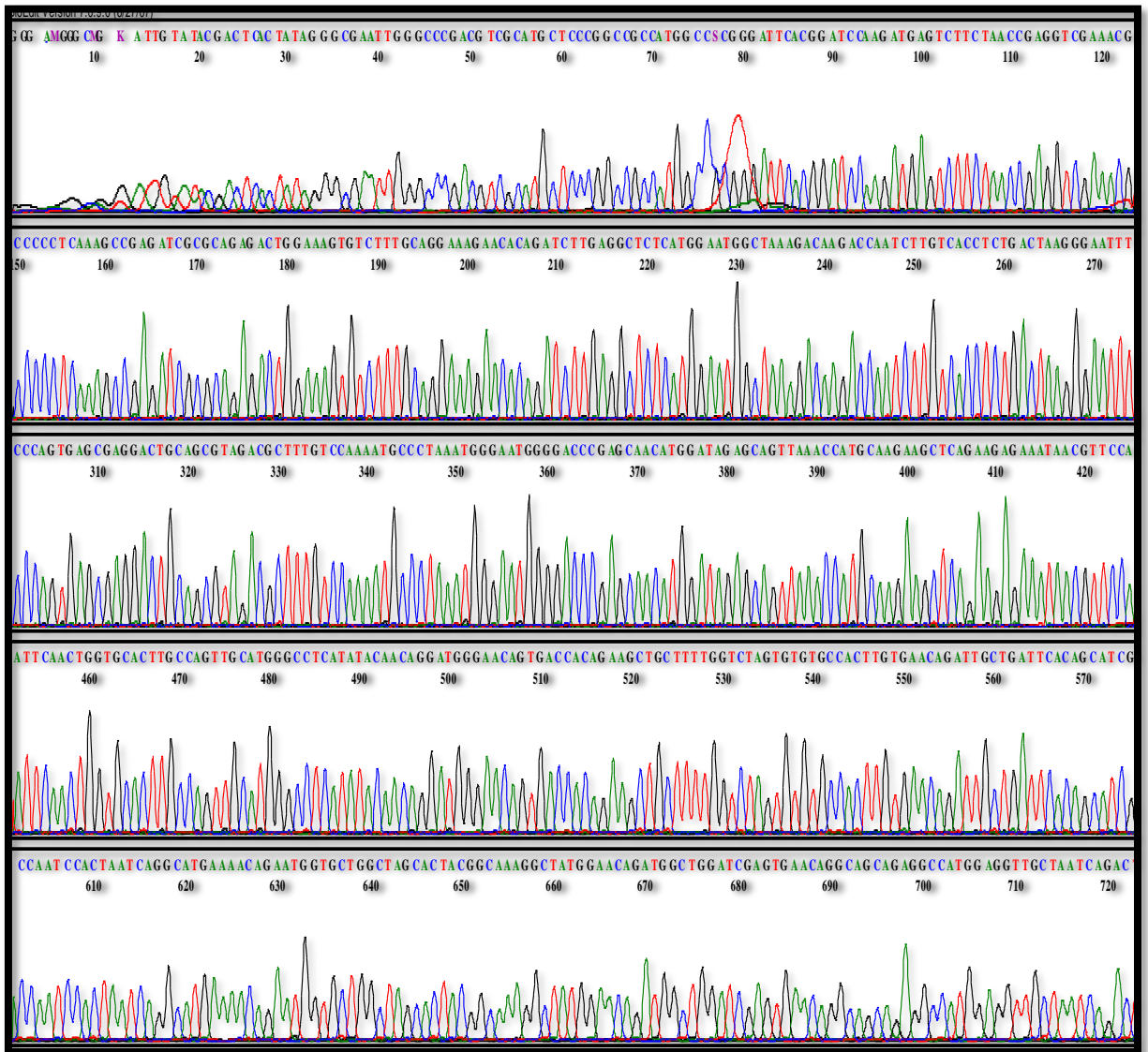
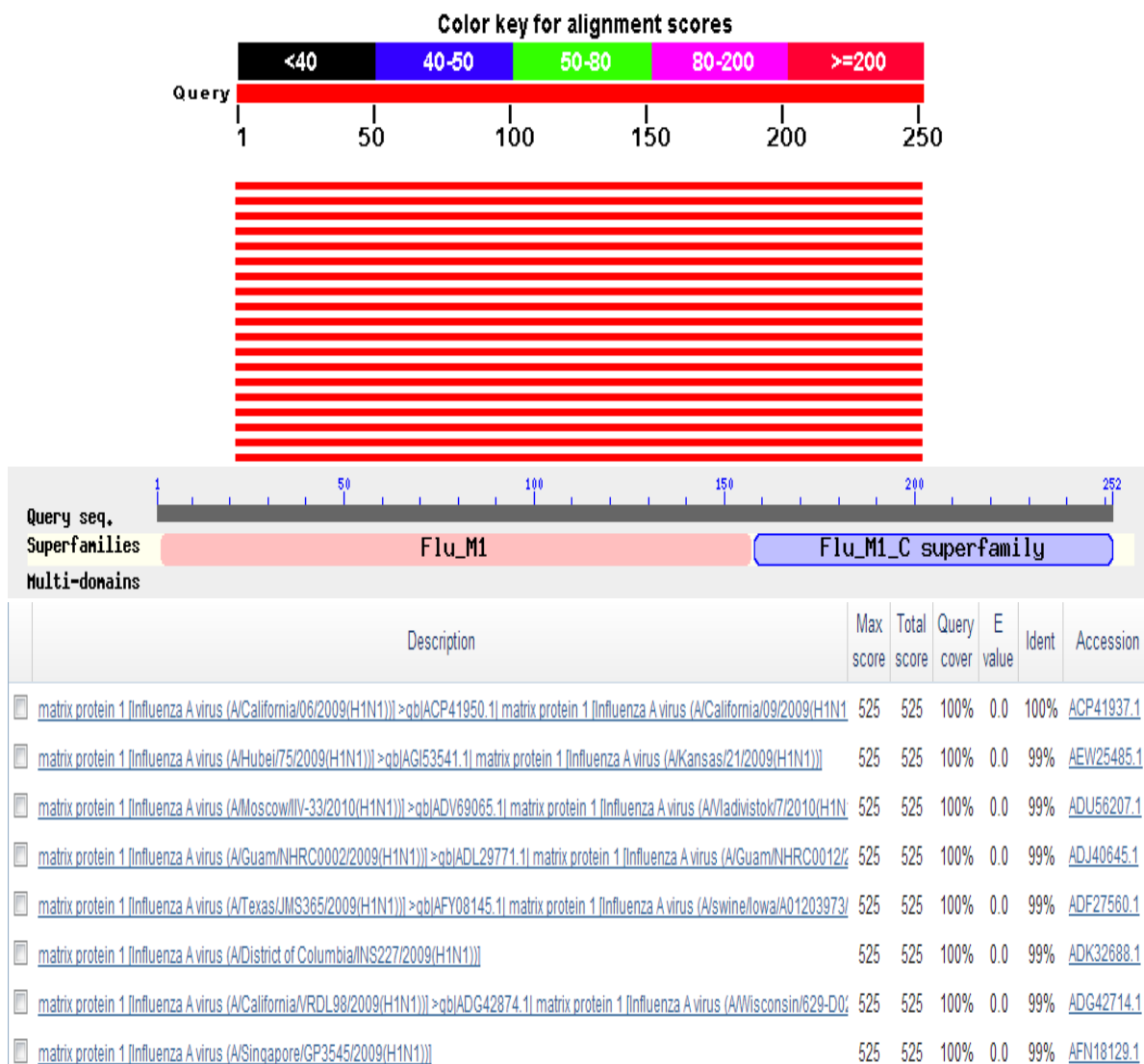


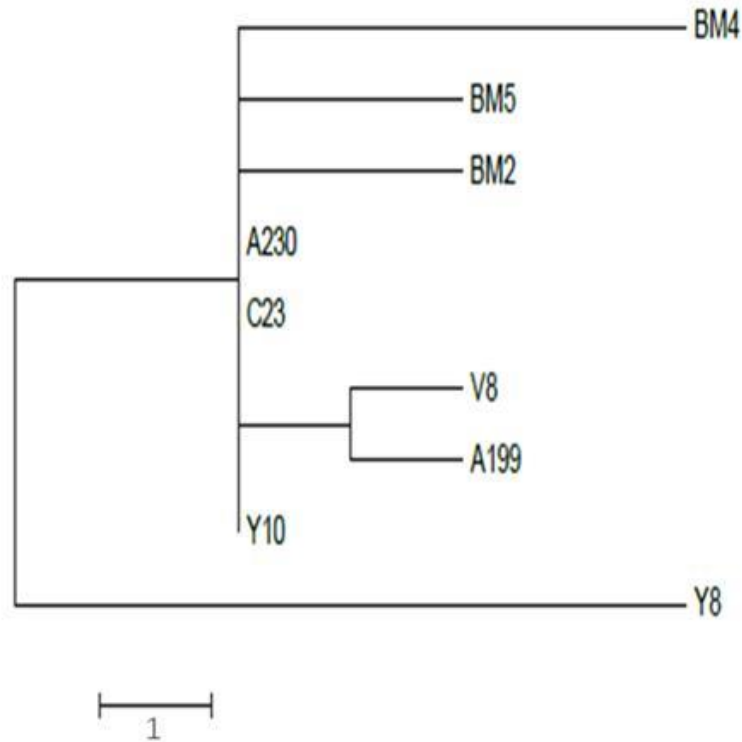
Figura 16. Cromatograma de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEMT-T/M1 de la cepa aviar V8. □ Marca los sitios de restricción de *Bam*HI y *Sal* I.



**Figura 17.** Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos deducida de la región codificante de la proteína M1 de matriz del virus Influenza A cepa Y8 utilizando el programa BLAST protein del NCBI.

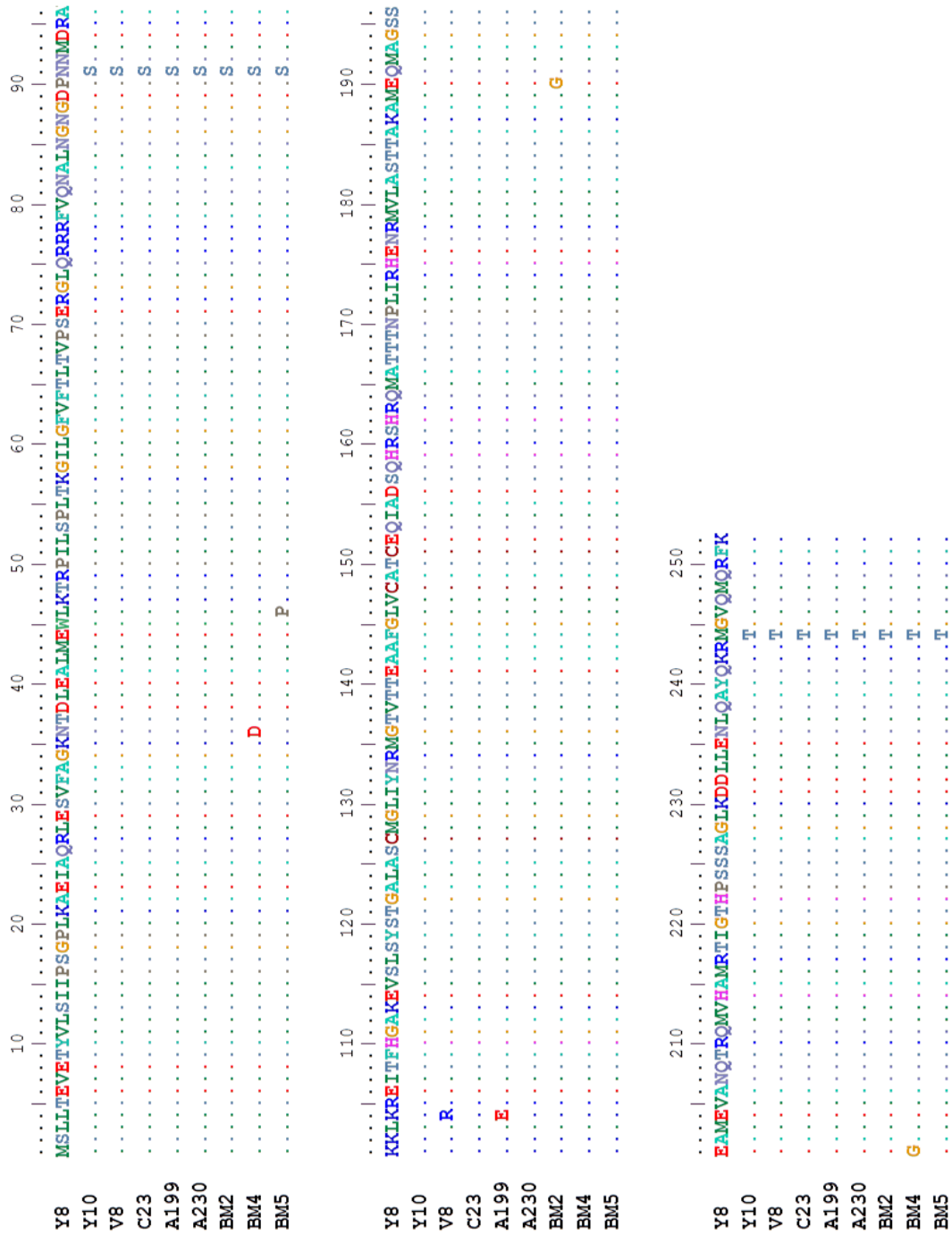
**Tabla 4.** Diferencias entre las secuencias de aminoácidos entre las cepas aisladas de campo (Programa MEGA 5.05).

	1	2	3	4	5	6	7	8
CEPA Y8								
CEPA Y10	4.00							
V8	5.00	1.00						
C23	4.00	0.00	1.00					
A199	5.00	1.00	1.00	1.00				
A230	4.00	0.00	1.00	0.00	1.00			
BM2	5.00	1.00	2.00	1.00	2.00	1.00		
BM4	6.00	2.00	3.00	2.00	3.00	2.00	3.00	
BM5	5.00	1.00	2.00	1.00	2.00	1.00	2.00	3.00



**Figura 18.** Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la región M1 en aves residentes y migratorias de México.

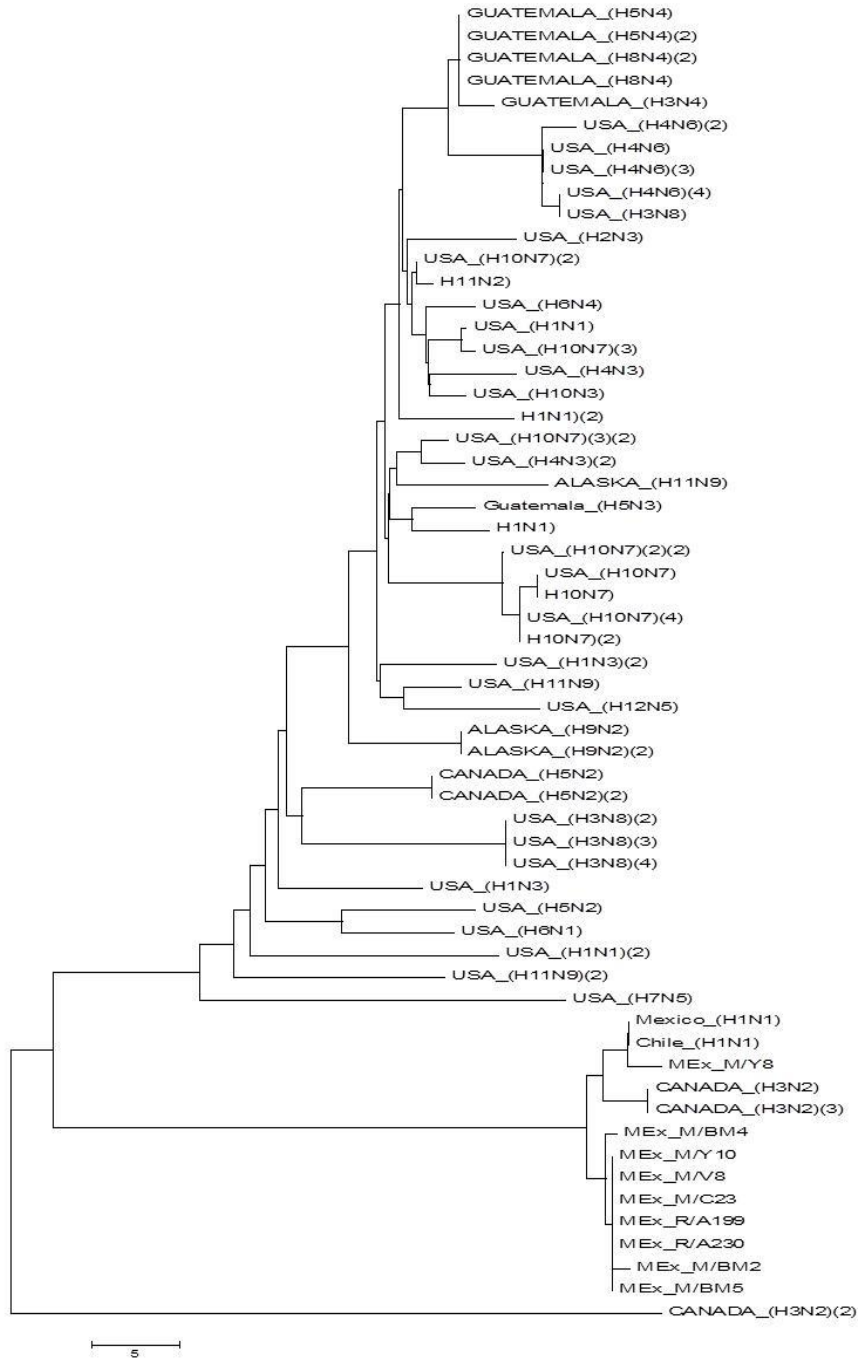




**Figura 19.** Análisis comparativo de las secuencias del gen 7 del virus influenza.

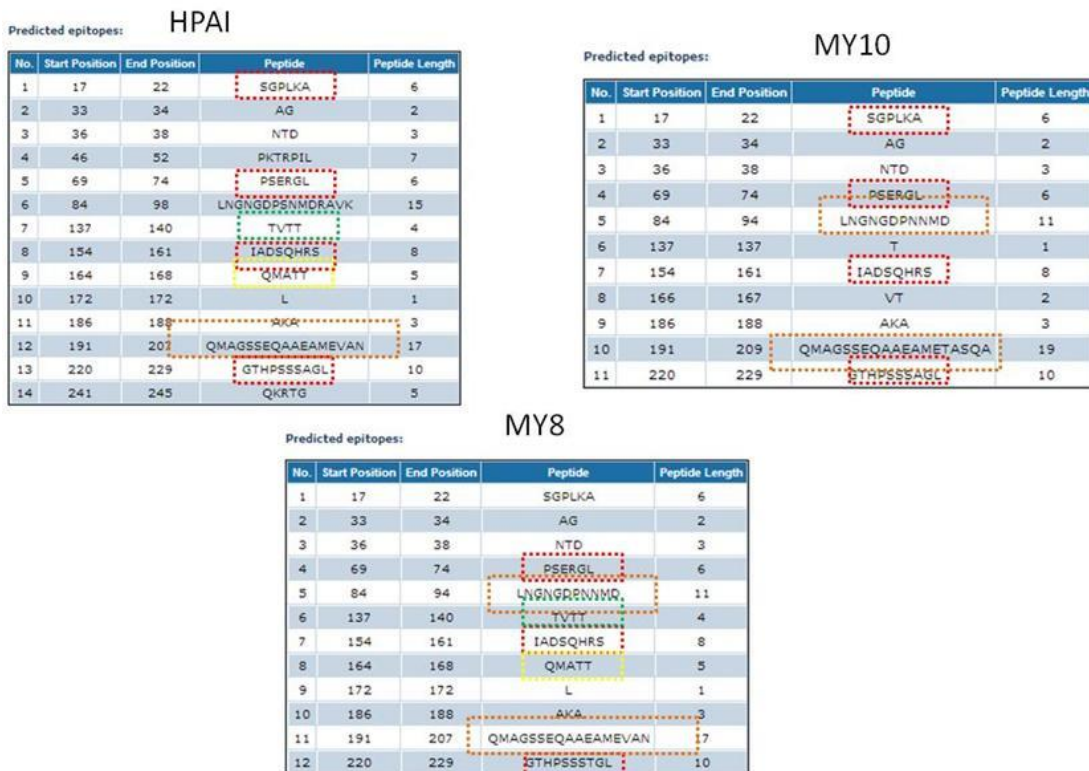
Las secuencias del gen 7 que se obtuvieron a partir de cepas aisladas en aves silvestres. Estas secuencias muestran diferencias entre ellas por lo que al analizar su secuencia de aminoácidos y al hacer el árbol filogenético se pudo observar que se crearon dos linajes dentro de este. Dentro del primer linaje se pueden observar 3 diferentes nodos o clados, dentro del primero se pueden observar las muestras BM5 y BM2 aisladas en el estado de Tamaulipas las cuales difieren en 2 aminoácidos en su secuencia deducida de aminoácidos. Dentro de este grupo la cepa BM4 difiere en 3 aminoácidos de las demás en su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, esto las coloca dentro del mismo grupo al compararse con el resto de las secuencias analizadas. El segundo grupo pudimos identificar a las cepas A230, C23, y Y10 de los estados de Coahuila, Tamaulipas y Yucatán respectivamente, sin embargo no existe diferencias entre estas secuencias que las difiera una de otra. El tercer grupo de este clado está compuesto por las cepas V8 y A199 de Nuevo León y Coahuila donde estas tienen una diferencia de un aminoácido en su secuencia. Finalmente dentro del segundo clado se encuentra la cepa Y8 la cual fue aislada en el estado de Yucatán, esta presentó una mayor variabilidad genética entre las cepas analizadas obteniendo una diferencia de hasta 6 aminoácidos con respecto a la cepa BM4, siendo esta con la que presentó una mayor diferencia. Con respecto a las cepas A230, C23 y Y10 presentó una divergencia de 4 aminoácidos. Para determinar cuáles cepas se emplearían en la producción de las proteínas recombinantes se compararon las secuencias que obtuvimos con algunas secuencias del virus influenza aisladas de aves en América que se encuentran publicadas en el GenBank agregando como control una cepa del virus influenza pandémico H1N1 del 2009 como control. De las cepas publicadas se identificaron que en su mayoría se encuentran reportadas secuencias aisladas a partir de aves de las familias *Anatidae* y *Gallinaceae* de alta patogenicidad. De este alineamiento se establecieron 3 clados principales; el primero contiene secuencias con 2 aminoácidos de diferencias de aminoácidos entre ellas. Dentro del segundo grupo, se determinó la presencia de dos subgrupos, donde dentro del primero se observó la secuencia pandémica H1N1 aislada de humano, un aislamiento de pavo doméstico con subtipo H1N1 de Chile y la muestra Y8 obtenida en el laboratorio, determinando una diferencia de 3 aminoácidos con las secuencias de aminoácidos, en el tercer grupo se encuentran muestras de Canadá subtipo H3N2. El segundo grupo del árbol contiene las demás

secuencias obtenidas en el laboratorio. Finalmente el tercer grupo contiene una secuencia de que contiene 40 aminoácidos de diferencia con el resto de las secuencias analizadas en este grupo estableciéndose en un grupo totalmente aislado del resto (Figura 20).



**Figura 20.** Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la región M1 en aves residentes y migratorias de América

Para determinar las diferencias y similitudes entre los inmunodominios de la proteína se utilizó la herramienta bioinformática Antibody Epitope Prediction para la predicción de epítopes en base a las características fisicoquímicas de los aminoácidos, para así determinar que muestras aisladas tenían esos inmunodominios conservados con las reportadas con la base de datos y entre las diferentes cepas del laboratorio ya secuenciadas. La cepa Y8 presenta 12 inmunodominios, siendo esta la que presenta mayor similitud con las cepas de alta patogenicidad que se encuentran en la base de datos. La cepa H1N1 aislada en el 2010 de un pavo doméstico, presenta los mismos epítopes inmunodominantes que Y8. Se seleccionó al azar una cepa de alta patogenicidad con el subtipo H5N2 de la cual se observaron 11 epítopes siendo los últimos los que mostraron mayor número de diferencias en comparación con las cepas aisladas en el laboratorio (Figura 21).



**Figura 21.** Análisis de predicción de epítopes lineales de cepas de alta patogenicidad, con respecto a las secuencias de la cepa Y8 y Y10.

En base a esta información se identificaron los posibles epitopes que se encuentran en las diferentes cepas aisladas y en las de alta patogenicidad reportadas en la base de datos. La cepa Y8 se seleccionó para la producción de la proteína recombinante por las diferencias que tiene con la cepa Y10 y los epitopes en común que tiene con las diferentes cepas de alta y baja patogenicidad reportadas en el NCBI. La cepa Y10 se eligió para la producción de la proteína recombinante M1 que se utilizara en los ensayos de detección de anticuerpos contra el virus influenza, ya que se recolecto en el mismo lugar y el mismo día que la cepa Y8, así como el hospedero del que provienen.

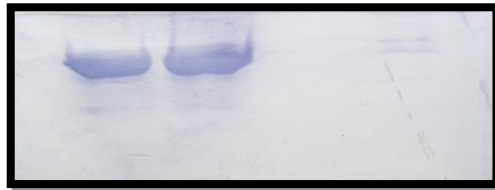
### 6.8 Expresión y purificación de la proteína M1 del virus influenza

Para la expresión y purificación de la proteína M1 del virus influenza de las cepas Y8 y Y10 se utilizó el plásmido pET-28a (+) para la expresión de las proteínas recombinantes y fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad. Bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas se indujeron utilizando IPTG. Las bacterias fueron lisadas empleando un método químico (Lisozima) y un método físico (Sonicación). El lisado bacteriano que contenía las proteínas recombinantes fue purificado por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes utilizando urea (4 M). Por medio de una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se observó la presencia de proteína M1 del virus influenza (27.5 kDa) en las fracciones purificadas del lisado bacteriano (Figura 22).



**Figura 22.** SDS-PAGE de proteína M1 recombinante. Fracciones purificadas por cromatografía de afinidad en gel de poliacrilamida al 11 %. Carriles 1,2,3,4,5 Y10 fracción purificada de M1 de la cepa Carriles 7,8,9, y 10 fracción purificada de M1 Y8de la cepa . Carril 6 Marcador de peso molecular.

Las proteínas purificadas fueron analizadas mediante un Western-blot para la confirmación de la identidad proteica empleando un anticuerpo monoclonal contra la proteína M1 del virus influenza, donde ambas proteínas fueron reconocidas por este anticuerpo (Figura 23).



**Figura 23.** Análisis de wester blot de las proteínas recombinantes con un anticuerpo monoclonal producido en cabra. Carril 1; cepa Y10, Carril 2; cepa Y8.

La cuantificación de las diferentes fracciones se realizó por un método semicuantitativo-cualitativo mediante la comparación de intensidad de bandas empleando un control de albumina bovina de concentraciones conocidas. La cantidad de proteína que fue administrada tanto en cabras y conejos durante los días 0, 15 y 30 fue de alrededor de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en una relación 1:1 proteína-adyuvante completo o incompleto de Freud según la etapa de inoculación en la que se encontraba la producción de los anticuerpos policlonales.

## **6.9 Ensayos de Elisa:**

### **6.9.1 Determinación del título de anticuerpos de trabajo para la detección de séricos en las muestras de aves.**

Los sueros obtenidos de cabra y conejo durante los días 0, 15 y 30 días fueron analizados por duplicado mediante Elisa de tipo indirecto para su titulación y determinar la dilución de trabajo que se empleó durante los ensayos de detección de anticuerpos en los sueros problema. Los sueros de cabra y conejo mostraron reactividad contra el antígeno

recombinante M1 de la cepa Y10 de los días 15 y 30. Se seleccionó la dilución 1:7000 para emplearse en el ensayo para la determinación de anticuerpos en los sueros problema ver tabla 5.

**Tabla 5.** Promedios de las absorbancias de la titulación de los sueros anti M1 de la cepa Y10.

Sueros Conejo			Sueros Cabra			Dilución
0.113	1.728	1.781	0.234	1.238	1.571	1000
0.095	1.6385	1.818	0.222	0.947	1.492	2000
0.074	1.393	1.7825	0.145	0.644	1.3375	4000
0.116	1.022	1.795	0.212	0.476	1.151	8000
0.071	0.57	1.64	0.091	0.2745	0.7915	16000
0.067	0.3295	1.3375	0.09	0.182	0.529	32000

Blancos	Dia 15
Dia 0	Dia 30

### 6.9.2 Evaluación del suero control positivo control el virus influenza tipo A humano.

Para emplear el ensayo de Elisa para la detección del virus influenza tipo A se analizaron dos sueros humanos. Uno de los sueros analizados corresponde a una persona que fue infectada por el virus influenza pandémico H1N1 del 2009, mientras que el otro pertenece a un individuo que fue vacunado dos veces durante el 2011. El ensayo se realizó de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor como se describió anteriormente en la metodología. Se detectó la presencia de anticuerpos contra el virus influenza en el suero anti-vacuna y suero anti-influenza pandémico obteniendo absorbancias en promedio de 1.59 y 3.14 respectivamente como se observa en la tabla 6. Los valores de absorbancias de los controles se encuentran dentro de los rangos que se manejan en el Kit comercial DGR<sup>®</sup> para determinar si el ensayo se realizó correctamente. Donde menciona que se debe obtener un cut off menor a 0.700.

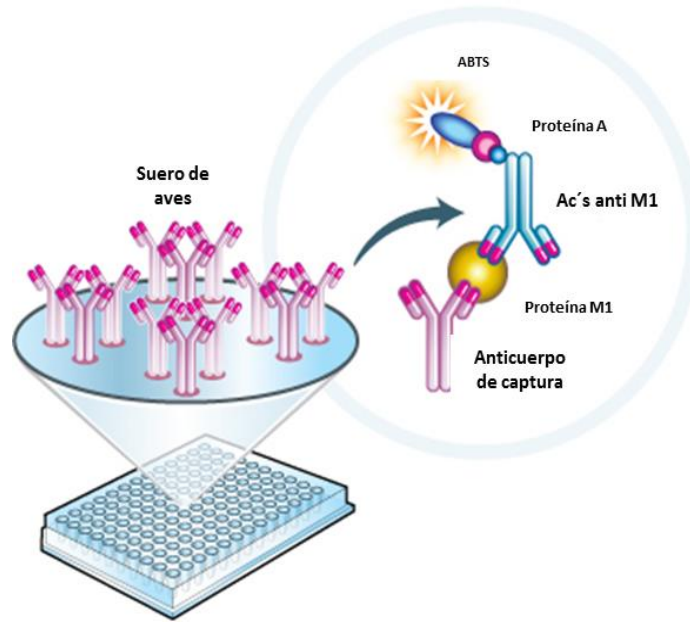
**Tabla 6.** Reactividad de sueros humanos usando el kit comercial DGR®

Muestra	Absorbancia
Cut off	0.609
Suero anti vacunal	1.171
Suero anti vacunal	1.147
Suero anti pandémica	3.068
Suero anti pandémica	3.186
Control positivo	3.094
Cut off	0.550
Control negativo	0.90

### **6.9.3 Detección de anticuerpos séricos contra el virus influenza utilizando la proteína recombinante M1 de la cepa Y10.**

Para detectar los sueros de aves silvestres con anticuerpos contra el virus influenza en las muestras obtenidas del 2010 a la fecha se empleó un ensayo de ELISA en el cual se utilizó el suero problema como anticuerpo de captura a una proporción de 1:10 en buffer de carbonatos pH 9.6 y anti-rM1Y10 como anticuerpo de detección a una dilución 1:7000 producido en conejo. El ensayo se normalizo utilizando como control positivo el suero humano anti-Vacuna y como control negativo suero fetal de bovino bajo las mismas condiciones que los sueros problema. Todas las placas de 96 pozos de fondo plano fueron sensibilizadas utilizando un mismo esquema (Figura 24 y 25) el cual nos permitió evaluar cada columna y cada fila sensibilizada. Cada muestra fue analizada por duplicado.



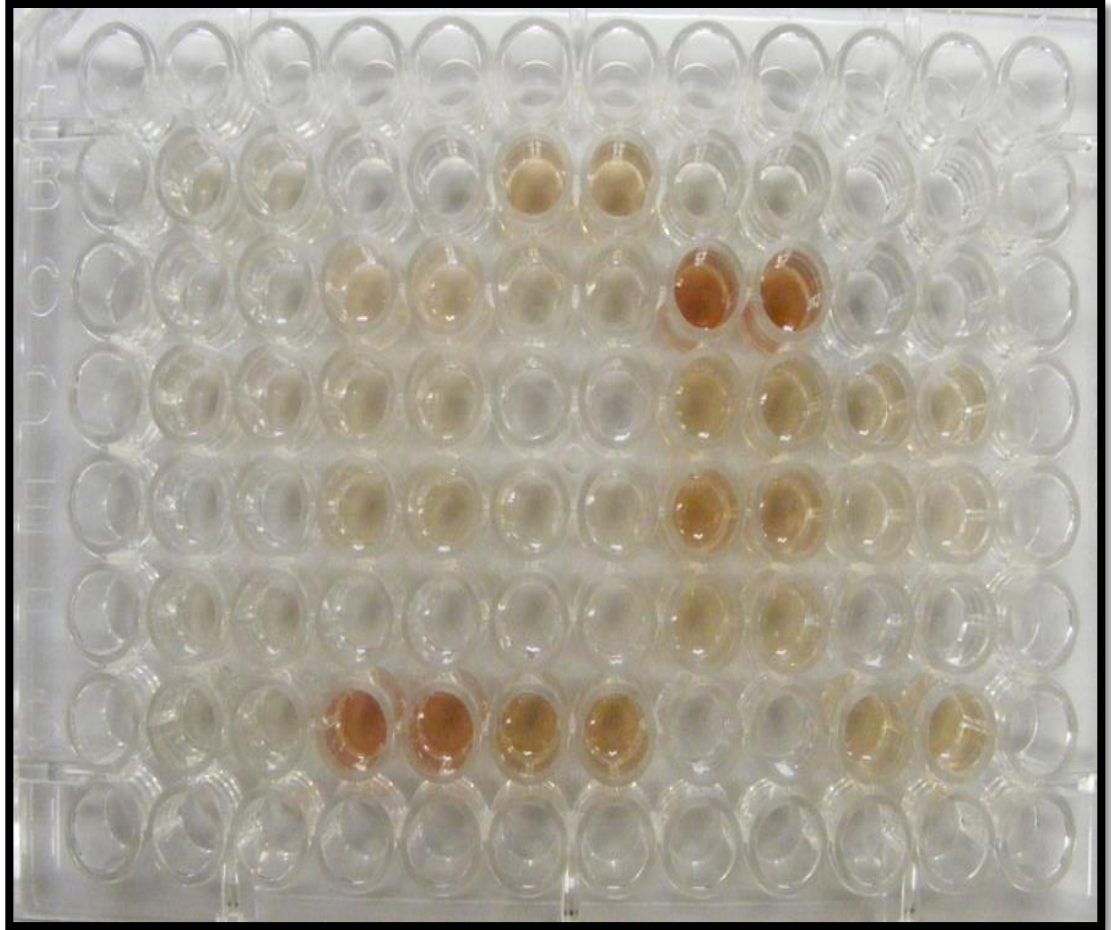


**Figura 24.** Esquema general del método de Elisa tipo HADAS para la detección de anticuerpos contra el virus influenza tipo A.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

C (-)

**Figura 25.** Formato de sensibilización de placas

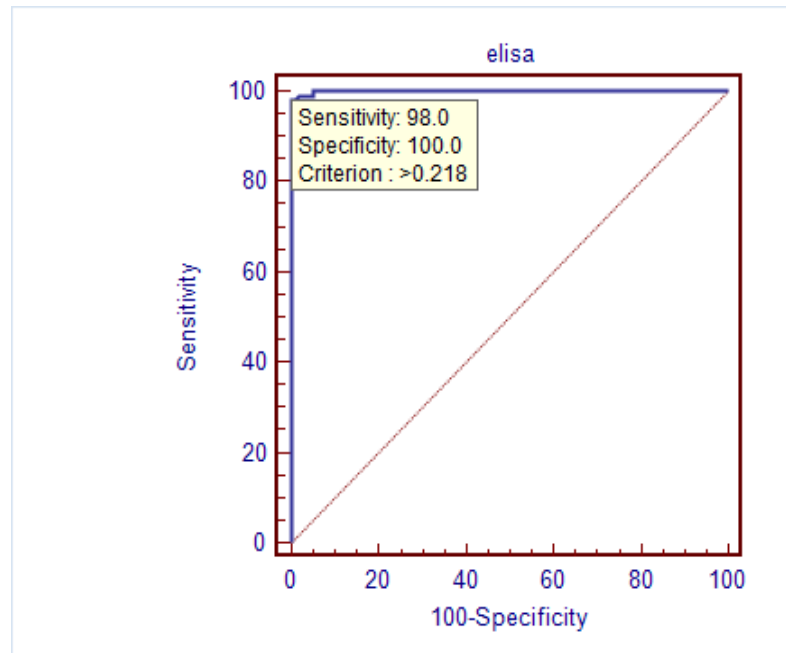


**Figura 26** Fotografía representativa de la sensibilización de placas para la detección de anticuerpos contra el virus influenza tipo A.

De las 635 muestras analizadas, 300 (47.2%) tuvieron reactividad con la proteína recombinante M1 de la cepa Y10. Se detectaron absorbancias ya con el factor de corrección aplicado desde 0.069 hasta 0.778 como se muestra en la tabla 7 de forma representativa de las absorbancias determinadas durante el análisis de las muestras.

A264	0.177	A38	0.292	16	0.444
A265	0.163	A40	0.484	25	0.184
A266	0.122	A41	0.225	13	0.057
A267	0.1545	A42	0.083	17	0.778
A268	0.2335	A43	0.346	49	0.354
A269	0.177	A44	0.301	51	0.406
A270	0.1615	A45	0.261	55	0.22
A273	0.3965	A48	0.235	58	0.396
A274	0.394	A49	0.240	61	0.403
A275	0.319	A50	0.267	40	0.428
A276	0.4575	A234	0.325	41	0.424
A277	0.4795	A235	0.275	42	0.355
A278	0.4725	A236	0.435	43	0.432
A279	0.251	A237	0.458	44	0.425
A280	0.2545	A238	0.325	45	0.299
A281	0.4205	A239	0.205	46	0.152
A300	0.2825	A240	0.174	48	0.434
A301	0.1575	A241	0.069	50	0.467
A302	0.307	A242	0.239	52	0.422
A303	0.1645	A243	0.292	53	0.327
A304	0.452	A244	0.481	54	0.39

Para el análisis estadístico de la validación del método aplicado en la detección de anticuerpos se seleccionaron al azar 200 muestras, tomando como patrón las primeras analizadas. Se tomo en como criterio para realizar el grafico de tipo ROC un método binario donde 0 es una muestra negativa, donde sea una absorbancia menor a 0.218 y positiva aquella mayor o igual a este valor. Una vez realizado el análisis estadístico utilizando el software MEDCalc se determinó que el ensayo empleando este punto de corte a una  $p = 0.05$  una sensibilidad del 98 % y una especificidad bajo estas condiciones del 100% (Figura 27).



**Figura 27.** Gráfico de tipo ROC del ensayo de Elisa tipo HADAS empleando el antígeno M1 de la cepa Y10.

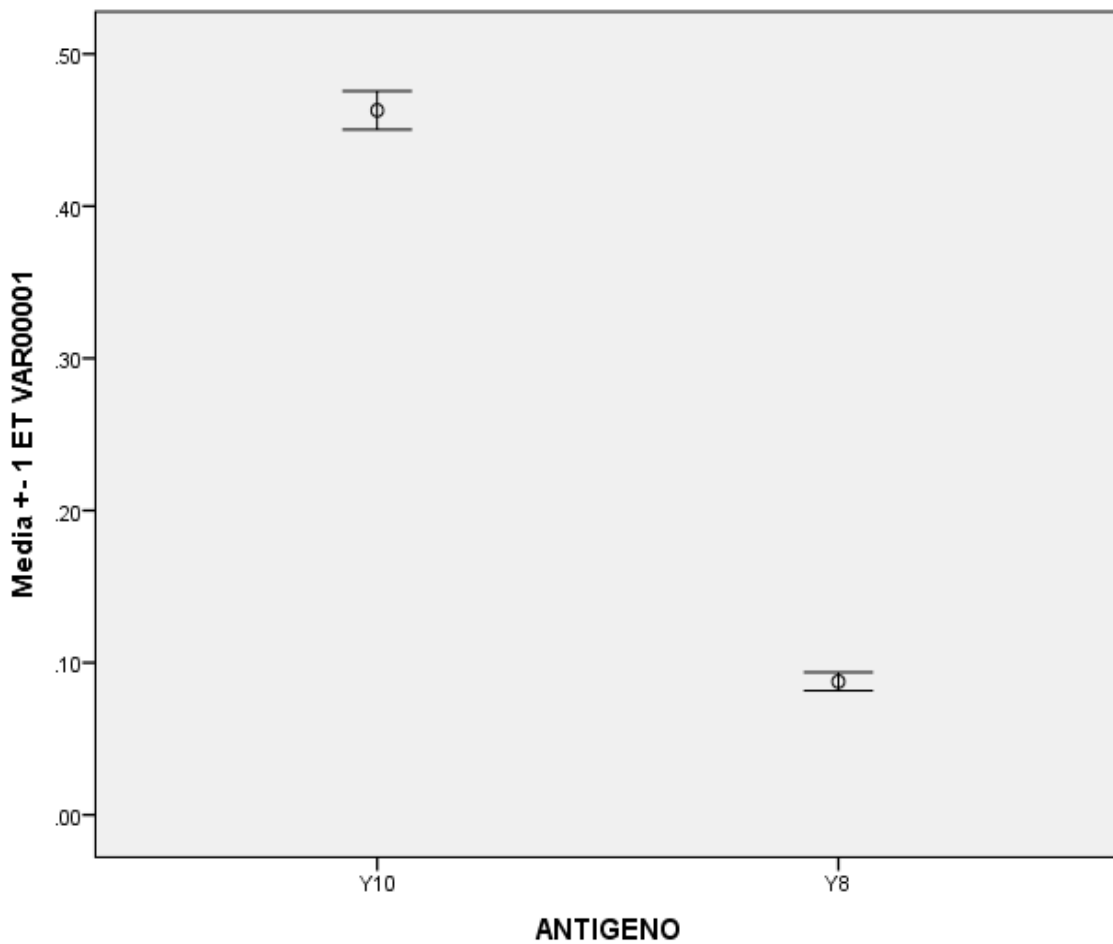
Se seleccionaron 161 muestras para el análisis con el antígeno M1 de la cepa Y8 para la detección de anticuerpos y así determinar si existía o no variabilidad antigénica en la proteína de matriz M1. El análisis se realizó de la misma manera que para el antígeno de la cepa Y10 utilizando el anticuerpo humano anti vacunal como control positivo. Se detectaron 7 muestras del total con una absorbancia superior a 0.218 como en el ensayo con el antígeno M1 de la cepa Y10.

Se analizaron las 161 muestras mediante un análisis de diferencias de medias y así determinar si existía alguna diferencia en los resultados utilizando los dos antígenos del virus con un índice de confianza del 95%. Al analizar los datos con el software SPSS se obtuvo una P de 0.000, por lo que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos, lo cual se puede observar en la tabla 6 cuando comparamos entre las mismas muestras el ensayo con los dos diferentes antígenos. Una vez obtenidos estos datos, procedimos a la validación del ensayo, pero determinando si existía alguna diferencia entre los resultados de ambos antígenos (M1Y8 y M1Y10) empleando el control positivo (suero humano anti Vacuna). Se procedió a realizar un ensayo de tipo ANOVA ONE WAY con un índice de confianza del 95% para determinar si el ensayo

con este suero control no tenía ninguna diferencia si se empleaba cualquiera de los dos antígenos. Tras realizar el análisis se observó una P de 0.000 determinando que no existía diferencia significativa entre la reactividad del control positivo con respecto a ambos antígenos (Figura 28).

**Tabla 8.** Anova de diferencia de medias

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ANTIGENO * VAR00001	Inter-grupos (Combinadas)	103.500	278	.372	34.996	.000
	Intra-grupos	1.500	141	.011		
	Total	105.000	419			
MUESTRAS * VAR00001	Inter-grupos (Combinadas)	298094.405	278	1072.282	1.723	.000
	Intra-grupos	87745.595	141	622.309		
	Total	385840.000	419			



**Figura 28.** Gráfico de error de la comparación de absorbancia entre los dos diferentes

## 7. DISCUSION

La influenza aviar actualmente es considerada la zoonosis más importante de las últimas décadas. Los constantes brotes detectados en el mundo en aves de corral y silvestres son de interés tanto para la industria avícola como para la conservación de la fauna, la sanidad animal y sobre todo la salud pública (Bertrán y Majo, 2013). Desde un punto de vista genético, las cepas del virus presentan una serie de mutaciones puntuales, inducidas por la presión de selección del sistema inmunológico, las cuales determinan ciertos cambios antigénicos que se designan como deriva antigénica. Este fenómeno es en parte el responsable de la necesidad anual de actualizar las vacunas contra el virus durante cada temporada. Los virus influenza pueden infectar una variedad de especies, aves, mamíferos (incluyendo al humano) y mamíferos acuáticos. La necesidad de un diagnóstico rápido de la influenza conduce a probar diferentes productos comerciales, aunque estos no hayan sido diseñados para cada especie esto debido a la rápida variabilidad genética y antigénica que sufre el virus (Reina and Prades, 2010). La proteína M1 se encuentra en todos los subtipos del virus influenza, independientemente a qué tipo de hospedero infecte, por lo que es un buen blanco para emplearse como diagnóstico molecular e inmunológico (Wang *et al.*, 2010). Actualmente se han detectado muchos brotes del virus influenza aviar alrededor del mundo, por lo cual se ha buscado diseñar métodos de diagnóstico más efectivos, sin embargo dada la gran variedad de hospederos y mutaciones que tiene el virus no se ha llegado a diseñar un método efectivo que abarque la gran variedad de hospederos que infecta. Se sabe que un solo cambio en la secuencia de aminoácidos puede llegar a generar cambios a niveles antigénicos en las diferentes proteínas del virus, por lo que es necesario realizar monitoreos constantes de estos cambios no solo a niveles genéticos, si no también antigénicos que puedan permitirle a las diferentes cepas de alta o baja patogenicidad escapar a la respuesta inmune generada por la vacuna. Esto se ha reflejado en la ineffectividad de los diferentes prototipos vacúnales que se han visto limitados a generar inmunoprotección para cierto grupo de cepas virus. Por otra parte se ha mantenido un estudio constante de epidemiología molecular del virus influenza sobre las aves

migratorias, ya que estas son el principal reservorio del virus, y causa principal de la distribución de este.

En este trabajo se determinó la variabilidad antigénica del virus influenza Tipo A entre la proteína de matriz M1 de dos cepas aviares.

En este análisis se emplearon 330 muestras cloacales y 635 muestras de suero para determinar si cambios genéticos influyen a nivel antigénico del virus. En este trabajo también se optó por determinar la presencia del virus no solo en estas aves, sino también en aves residentes, con el fin de identificar de forma más precisa la distribución del virus influenza en la población aviar en 5 estados de México.

De las 342 muestras analizadas por RT-PCR un total de 84 resultaron positivas lo cual representa un 24.6 % del total de las muestras. Este porcentaje es mayor a los datos reportados en América y el resto del mundo ya que se han registrado valores de incidencia por este método de hasta 17% en Europa. Sin embargo estos datos solo corresponden a estudios que se basan en aves migratorias principalmente en aves de los órdenes Anseriformes, Charadriiformes, y en algunos casos Galliformes. Estos estudios también determinan la presencia de cepas de alta patogenicidad circulando en las diferentes rutas de migración y/o granjas de producción acuícola, y muestran la importancia de la detección precisa del virus.

Se realizó un análisis de las secuencias obtenidas de 9 secuencias de la región codificante de la proteína M1, por lo cual se dedujo la secuencia de aminoácidos, esto ya que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos son puntuales en el gen (Salazar et al., 2010), una vez determinada esta secuencia se podría inferir si existirá algún cambio a nivel proteínico. La proteína M1 no solo brinda soporte al virus, si no se ha relacionado con otros mecanismos en la célula, uno de los factores donde se ha relacionado es en la tasa de replicación del virus, donde se determinó que una sustitución de T/A en la posición 139 de la región que codifica para esta proteína puede ser favorecida (Smeenk y Brown, 1994). Se identificaron hasta 9 aminoácidos diferentes entre las diferentes secuencias obtenidas en este trabajo, sin embargo pudimos identificar que la cepa Y8 predominaba un patrón de 4 aminoácidos de diferencia con respecto a las demás secuencias; S, P, C y T en las posiciones 91, 99, 100 y 244 respectivamente. Este patrón se identificó en las secuencias de Y10, C23 y A230 siendo esta la diferencia con respecto a Y8. En la cepa

V8 y A199 se determinó que en la misma posición existían cambios de aminoácidos, sin embargo los cambios eran de una R y E respectivamente en la posición 104. Para las muestras BM5 y BM4 presentaron el mismo número de diferencias, mostrando variación en la P de la posición 46' y una G en la posición 190. Finalmente en la secuencia de aminoácidos de la cepa BM4, se identificó una diferencia de 5 aminoácidos con respecto a Y8, identificando dos cambios que no correspondían al patrón de diferencias con las demás secuencias, siendo los cambios en la posición 36 de un D y una G en la posición 201. La secuencia aminoácidos de M1 de Y8 es la secuencia con un mayor número de diferencias en comparación con las demás esto debido a los cambios diferentes cambios que presenta. Estas variaciones en las secuencias de aminoácidos le confieren a la proteína propiedades hidrofílicas que pueden llegar a modificarse por mutaciones en el sitio de unión con las diferentes proteínas, induciendo un cambio en la virulencia del virus (Sha y Luo, 1997)

El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos entre Y8 y Y10, mostro 4 sustituciones. De las cuales, dos son sustituciones conservativas, ya que estos poseen propiedades fisicoquímicas similares. Estos cambios podrían no modificar la estructura de la proteína. Sin embargo las diferencia en las posiciones 99 (L/P) y 244 (M/T) en donde se sustituye por aminoácidos con naturaleza distinta, o como en el caso de la sustitución de la P que si pudiera llegar a modificar la estructura por la falta de giro de este aminoácido. Este tipo de cambios, puede llegar a convertirse en un cambio en las propiedades fisicoquímicas (pH) en un epítope. Sin embargo al determinar el pH isoelectrico de la proteína determinamos que no existían diferencias.

Para la detección de las variantes antigénicas se realizó la producción de la proteína recombinante M1 de la cepa Y8, la cual muestra una diferencia de 4 aminoácidos con respecto a la cepa Y10. La cepa Y8 en el análisis filogenético se coloca en un clado diferente al resto de las secuencias obtenidas en este estudio. El análisis comparativo de estas secuencias nos permite determinar si las diferencias de estos aminoácidos pueden influir antigénicamente en las propiedades antigénicas de esta proteína.

La M1 de la cepa Y8 tiene un 100% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la M1 de la cepa pandémica del 2009. La proteína M1 de la cepa Y10 muestra epitopes



lineales relacionados con cepas de alta y baja patogenicidad, reportados en la base de datos.

En el 2010 Mathieu detecto la secuencia de aminoácidos del gen 7 de la cepa pandémica H1N1 en pavos domésticos, mientras que en el 2010 Berhane identifico esta secuencia de M1 en pavos de producción de huevo, donde comenzaron a ver una disminución de la producción de este, siendo un dato interesante que nosotros en el 2011 en un pato migratorio *Anas discors* fue identificada esta secuencia. Esta información nos permite de cierta manera inferir en la importancia de la dispersión de ciertos virus por mediante aves silvestres no migratorias, dato que difiere de un estudio que se realizo en el 2013 en la Lima, Perú donde emplearon como centinellas patos domésticos (*Cairina moschata*) durante 70 días, los cuales no resultaron infectados por el virus influenza (Rondon *et al.*, 2013).

La identidad de las rM1 tanto de Y8 como para Y10 se analizó por Wester-Blot empleando un anticuerpo comercial, donde observamos que ambas tenían la misma reactividad de manera cualitativa con este anticuerpo monoclonal producido en cabra, mostrando la misma intensidad de reacción.

Para determinar la presencia de anticuerpos IgG contra el virus se produjeron proteína M1 recombinante de la cepa Y10. Esta proteína se empleó para la producción de anticuerpos en conejo. Estos anticuerpos se utilizaron en el ensayo de Elisa como anticuerpo de detección. Para la detección de anticuerpos se empleó un ensayo de Elisa tipo HADAS. Debido a la falta de un anticuerpo anti IgG universal de las diferentes especies aviares marcado con una enzima, se empleó el suero de las aves como anticuerpo de captura. Asimismo, se utilizó como anticuerpo positivo un suero humano anti influenza previamente analizado con un kit comercial. El control negativo fue suero fetal de bovino.

De las 635 muestras analizadas, se detectaron anticuerpos contra la proteína M1 de la cepa Y10 en un total de 300 sueros, lo cual representa un 47.2 %. Estos datos son similares a los reportados en otras regiones del mundo.

Para el análisis a niveles antigénicos, se procedió al análisis de 161 muestras que mostraron reactividad con la rM1 de la cepa Y10 y determinar si también mostraban reactividad con la rM1 de Y8.

De las muestras analizadas solo 7 muestras mostraron una absorbancia superior al punto de corte (0.218) empleado para determinar si los suero tenían o no anticuerpos contra M1. Estadísticamente no existe una diferencia significativa en utilizar el suero humano positivo que se utilizo como control, esto quizás porque el suero humano se obtuvo de un adulto de 24 años, el cual presumiblemente ha sido infectado por cepas estacionales durante su vida, así como de la vacuna utilizada para prevenir infecciones de la cepa pandémica del 2009. Por otra parte existen diferencias estadísticamente significativas en el ensayo con los demás sueros utilizando los diferentes antígenos, las absorbancias que se detectaron empleando el antígeno de la cepa Y10 muestra valores más altos, lo cual puede deberse a que la cepa Y8 según el análisis de filogenia, presenta diferencias mayores que la cepa Y10 con las demás secuencias.

Estos resultados sugieren que cambios leves en la secuencia de aminoácidos de la proteína M1 pueden ser suficientes para cambiar las características antigénicas y escapar a su detección.

## 8. CONCLUSIONES

- La secuencia de la proteína M1 de las cepas de estudio presentan identidad superior al 98%
- La proteína M1 de la cepa Y8 presenta 100% de homología con la proteína M1 del virus influenza humana H1N1.
- Anticuerpos policlonales del suero de aves reaccionan con la proteína recombinante M1 de influenza aviar.
- La proteína recombinante M1 de la muestra Y10 presenta mayor reactividad con los sueros de aves de este estudio.
- Cambios de hasta 4 aminoácidos de la proteína M1 recombinante alteraron el patrón de reactividad.

## 9. REFERENCIAS CITADAS

1. Allen J, Gardner S, Vitalis E, Slezak T. 2009. Conserved amino acid markers from past influenza pandemic strains. *BMC Micro*. 9:1-10.
2. Berhane Y, Ojkic D, Neufeld J, Leith M, Hisanaga T, et al. (2010) Molecular characterization of pandemic H1N1 influenza viruses isolated from turkeys and pathogenicity of a human pH1N1 isolate in turkeys. *Avian Dis* 54: 1275–1285. doi:10.1637/9422-061410-Reg.1.
3. Bertran K. and Majó N. 2013. Situación actual de la influenza aviar. Newsletter de patología.
4. Brochet A-L., Guillemain M., Lebarbenchon C., Simon G., Fritz H., Green A.J., Renaud F., Thomas F. & Gauthier-Clerc M. 2009. The potential distance of highly pathogenic avian influenza virus dispersal by Mallard, Common Teal and Eurasian Pochard. *Ecohealth* 6(3): 449-457.
5. Bouvier, N. M., and P. Palese. 2008. “The biology of influenza viruses”. *Vaccine* 26 Suppl 4:D49-53.
6. Buscaglia C. 2004. Influenza Aviar. In *Vet*. 6: 71-84.
7. Chen, W., P. A. Calvo. 2001. “A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death”. *Nat Med* 7:1306-12.
8. Ellis T., bousfield B., Bissett L., Dyrting K., Luk G., Tsim S., Sturm K., Webster R., Guan Y., Malik J. (2004). Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol*. 33:5. 492-505.
9. Furuse Y., Suzuki A., Kamigaki T., Oshitani H. 2009. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virol J*. 6:69.
10. Hatta, M. and. Hatta Y. 2007. “Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice” *PLoS Pathog* 3:1374-9.
11. Ito T., Gorman O., Yoshihiro K., Bean W. and Webster R., (1991). Evolutionary Analysis of the Influenza A Virus M Gene with Comparison of the M1 and M2 Proteins. *J Virol*. 65:5491–5498.

12. Jiao, P., G. Tian,. 2008. "A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice" *J Virol* 82:1146-54.
13. Jindal N.,Chander Y., Abin M., Steevatsan S., Stallknecht D., Halvorson D.,Goyal S. 2009. Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method. *J Virol Methods*. 160:163–166.
14. Lebarbenchon C., Albespy F., Brochet A-L., Grandhomme V., Renaud F., Fritz H., Green A.J., Thomas F., van der Werf S., Aubry P., Guillemain M. & Gauthier-Clerc M. 2009. Spread of avian influenza viruses by Common Teal (*Anas crecca*) in Europe. *PLoS ONE* 4(10): e7289.
15. Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao. "The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses". 2006 *J Virol* 80:11115-23.
16. Ma W, Brenner D, Wang Z, Dauber B, Ehrhardt C, Högner K,. 2010.The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. *J Virol*;84:2122-2133.
17. Mathieu C, Moreno V, Retama P, Gonzalez A, Rivera J, et al. 2010. Pandemic (H1N1) 2009 in breeding turkeys, Valparaiso, Chile. *Emerg Infect Dis* 16: 709–711. doi:10.3201/eid1604.091402.
18. Maxted A., Page M., Goekjian V., Brown J., Niles J., Dey, Kevin D., Kalasz D., Swayne D.E. 2012. Avian influenza virus infection dynamics in shorebird hosts. *Journal of Wildlife Diseases* 48(2).
19. Ming-Shiuh L., Poa-Chun Ch., Jui-Hung S., Ming-Chu Ch., Happy S. 2001. identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*. 200;13-22.
20. Montalvo-Corral M, Lopez-Robles G, Hernandez J. 2010. Avian Influenza Survey in Migrating Waterfowl in Sonora Mexico. *Transboundary and Emerging Diseases*. 58 (2011) 63–68.
21. Nitar N., Qigai H., Sudarat D., Qingyun D., Ivanus M., Yukol L., Fenner B., Spencer L.,Kwang L. 2006.Expression of hemagglutinin protein from the avian

- influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiology* 2006, 6:16.
22. Qi X, Li X, Rider P, Fan W, Gu H, Xu L, Yang Y, Lu S, Wang H, Liu F. 2009. Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from raccoon dogs in China. *PLoS One*. 4(3):e4682.
  23. Palese, P., and M. Shaw. "Orthomyxoviridae: The viruses and their replication". 2001. p. 1647-1689. In D. Knipe and P. Howley (ed.), *Fields Virology*, Fourth Edition ed, vol. II.
  24. Rabadan R, Levine A, Krasnitz M. Non random reassortment in human A influenza viruses. *Influenza Other Respiratory Viruses* 2008;2:9-22.
  25. Rees P. and Dimmock N. 1981. Electrophoretic separation of influenza virus ribonucleoproteins. *Journal of General Virology*. Vol. 53. 125-132.
  26. Reina J, Prades C. Utilidad de un método comercial de detección antigénica en el diagnóstico de la gripe A (H1N1) pandémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010.
  27. Rossman J. and Lamb R. Influenza Virus Assembly and Budding. 2011. *Virology*.; 411(2): 229–236. doi:10.1016/j.virol.2010.12.003.
  28. Rondon J., Icochea E., Gonzalez A., Gonzalez R. 2013. Targeted surveillance of avian influenza in wild birds using domestic ducks (*cairina moschata*) as sentinels. *Rev. investig. vet. Perú* vol.24 no.3.
  29. Salazar M., López O., León G., Ramírez J., Castro M. 2010. El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. *GacMédMéx*, 146:199-206.
  30. Seo, S. H., E. Hoffmann, and R. G. Webster. 2002."Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses" *Nat Med* 8:950-4.
  31. Sha B. & Luo M. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nature* 4:3.
  32. Smeenk C.A., Brown E.G.1994. The influenza virus variant A/FM/1/47-MA possesses single amino acid replacements in the hemagglutinin, controlling virulence, and in the matrix protein, controlling virulence as well as growth. *J Virol* 68:530-534.

33. Steel, J., A. C. Lowen, S. Mubareka, and P. Palese. 2009. "Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N" *PLoS Pathog* 5:e1000252.
34. Swayne D., Suarez D. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Tech.Off.* 19:463-482.
35. Tong S., Lia Y., Rivailierb P., Conrardya Ch., Castillo D.A., Chenb L., Cox N.J., Andersona L.J., Rupprechtd Ch. E., Donisb R.O. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Journal PNAS*.
36. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., 2013. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.*
37. Varghese, J. N., W. G. Laver, and P. M. Colman. 1983. "Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution" *Nature* 303:35-40.
38. Wakefield L. and Brownlee G. 1989. RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Research*. Vol. 17, 8569-8580.
39. Wang d., Harmon A., Jin J., Francis D., Christopher-Hennings J., Nelson E., Montelaro R.C., Li F. 2010. The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles. *J. Virol.*, 84. pp. 4673–4681
40. Webster R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, and Y. Kawaoka, 1992. "Evolution and Ecology of Influenza A Viruses," *Microbiological Rev.*, vol. 56, no. 1, pp. 152-179,
41. Webster RG, Krauss S, Hulse-Post D, Sturm-Ramírez K. 2007. Evolution of influenza A viruses in wild birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(3): S1-S6.
42. Whittaker G., Bui M., Helenius A. 1996. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *Journal of Virology*. Vol. 70, 2743-2756.
43. Wright, P., G. Neumann, and Y. Kawaoka. 2006. "Orthomyxoviruses" *Fields Virology*, Fifth Edition ed, vol. II. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1691-1740.

44. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998;351:467-471.
45. Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang, and P. Palese. 2005. "Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1" *PLoS Pathog* 1:e4.
46. Zhirnov O. 1992. Isolation of matrix protein M1 influenza viruses by acid-depend extraction with nonionic detergent. *Virology*. Vol. 186, 324-330.
47. Zhirnov O. and Klenk H. 1997. Histones as a target for influenza matrix protein M1. *Virology*. Vol 235, 302-310.
48. Zhirnov O., Ksenofontov A., Kuzmina S. 2002. Interaction of influenza A virus M1 matrix protein with caspases. *Biochemistry*. Vol 67 (5), 534-539.