



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

CARACTERIZACIÓN DE EPÍTOPOS INMUNODOMINANTES DE
LA PROTEÍNA SPIKE DEL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA
AVIAR Y SU COMPARACIÓN CON LOS SITIOS RESPECTIVOS
DEL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO SEVERO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

JOSÉ ALBERTO CAMPILLO BALDERAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. KARLEN GAZARIAN GAZARIAN

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de Febrero de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **JOSÉ ALBERTO CAMPILLO BALDERAS** con número de cuenta **505017473** con la tesis titulada "**Caracterización de epítomos inmunodominantes de la proteína spike del virus de bronquitis infecciosa aviar y su comparación con los sitios respectivos del virus del síndrome respiratorio agudo severo**", realizada bajo la dirección del **DR. KARLEN GAZARIAN GAZARIAN**:

Presidente: DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS
Vocal: DR. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN
Secretario: DRA. KARLEN GAZARIAN GAZARIAN
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DRA. BLANCA HAYDÉ RUÍZ ORDAZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de Septiembre de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme realizar mis estudios dentro del Programa de Maestría en la Especialidad de Biología Experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado con el registro 189620 para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM por la beca complementaria.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por la beca otorgada gracias al proyecto IN210402.

Al Dr. Karlen Gazarian (Tutor Principal), Dr. José Álvaro Aguilar Setién y Dr. Rogelio Alonso por formar parte de mi Comité Tutorial.

A los miembros de mi Jurado de Examen: Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. Blanca Ruíz Ordaz, Dr. Carlos Eslava Campos.

DEDICATORIA

A mi siempre lozana **abuelita materna...** donde quiera que te encuentres, agradezco enormemente cada uno de los minutos de tu vida que nos dedicaste a mi hermano y a mí a pesar de que éramos unos hijos de... nuestra madre, tu hija, siempre calmaste mil dolores y sacaste un sinnúmero de sonrisas a estos dos gráciles e inocentes infantes. Te quiero.

A mis admirables **padres** que me dieron la dicha de estar aquí disfrutando de esta vida en todas sus formas y, no tan solo eso les bastó para verme feliz, sino también me ayudaron a caminar y ¿saben padres?, ¡ahora puedo correr! Si vieran cuántas madrizas me he dado en el camino, pero gracias a ustedes, he podido levantarme muchas veces y, aunque sea rengo, llego a la meta. ¡Los amo!

¿MÁS AGRADECIMIENTOS?

A mi hermano Juan, a quien nunca terminaré de conocer (pero eso no significa que no lo tengo presente todos los días), solo le digo: “el orgullo restringe el devenir de tus logros... no seas gacho, las paces, ¿no?”

A los doctores Karlen y Tatiana Gazarian por su apoyo incondicional, no tan solo para desarrollar y culminar mi proyecto de investigación de la maestría, sino por sus oportunos consejos paternos que siempre me motivaron a no desistir.

A mis “viejos” del alma con quienes compartí y comparto tantas noches... y días, mis queridos “chavos del ocho” de Copilco El Bajo, los tengo muy presentes porque ustedes definieron una parte de lo que soy ahora. Helxine y Lázaro... mis hermanos, César y José Luis... mis hermanitos. Juan Pablo (“Doc”), gracias amigo por las tantas corridas (¡albúr aparte!) y charlas juntos. Don César, David, Fermín, Álvaro, Edén, Omar, Mauricio, Eliane, Mohammed, -pasumecha, ¿pos cuántos éramos y somos?-, “Lety”, Osvaldo, Iván, Eliel, “Mix”, Óscar, “Miau”, “Huicho”, Miguel, y hasta el recién llegado “Nacho”... gracias por tener algún impacto en mi vida.

A mis entrañables amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (por orden de antigüedad): Fernanda, méndiga, simplemente te quiero un chingo; Fabiola, ah, estos obstáculos que evitan nuestra felicidad, ¿no crees?; Yadira, uno de mis modelos a seguir; Margarita, mil gracias por cuidarme en el laboratorio; Angélica, por más que le pensé, no pude expresarme sobre ti, ¿o sí?; Alfredo, amigos como tú, ¿quién quiere hermanos?; Sara, tu picardía me deleitaba; Guadalupe, tú ciega de un ojo y yo ciego del otro, pero juntos podemos ver el camino sin tropezar; Evelyn, “ñoñis” preciosa. También agradezco a Lupe “ojitos”, Vane, Naya, Pablo, Lorena, Dr. Padilla, Layla, Daniel, Carlos, Víctor, Martín, Perla, Ana, Brenda, Wendy y a todos aquéllos que no podré nombrar aquí por falta de espacio, muchas gracias por formar parte de mi vida.

A mi “jefecito” Ricardo Hernández por su gran ayuda en la elaboración de mi proyecto.

A mis amigos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: Amanda, por tus consejos siempre tan atinados; Julieta, de milagro no piamos; Alfonso, Abel, Mariana, Rafael y Pablo, por su ayuda no tan solo en la obtención y manejo de anticuerpos de mis “pollos”, sino saber que se puede trabajar bien y reír al mismo tiempo.

A mis amigos del Museo de Ciencias Universum: “Choche”, “Yaz”, “Lola”, “Raque”, “Nefas”, Pedro, Diego e Irene... extraño el ocaso en el museo.

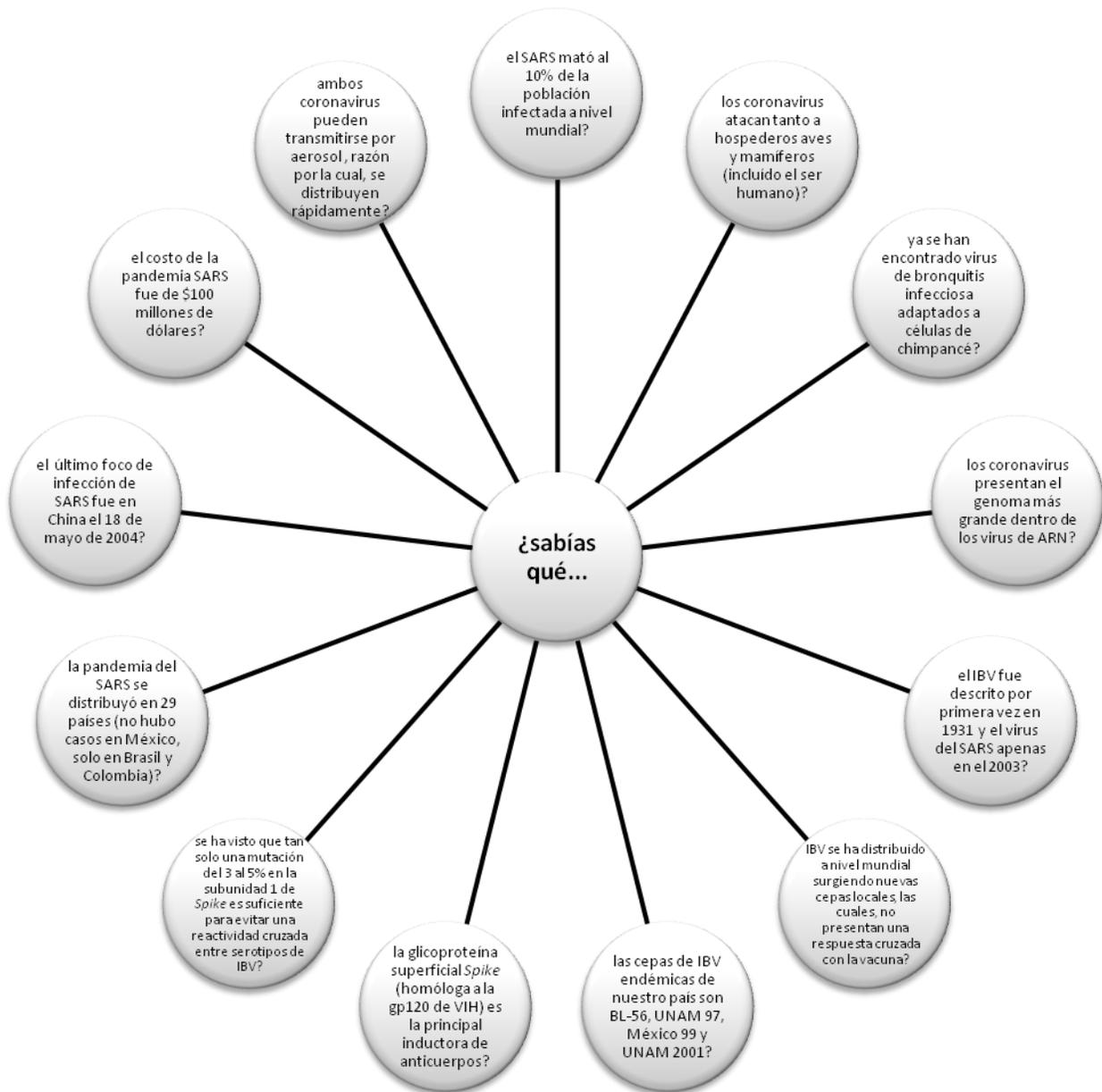
A Martín Bonfil, por sus frases que despiertan la curiosidad y el asombro por saber que la realidad misma es solo un puñado de modelos que intentan representarla.

A todos mis estudiantes latosos de la prepa (“biomocosos”) y de la Universidad (“prokos” y “virolocos”) que sin ellos no habría podido darle sentido al concepto de responsabilidad... uf, ¡yaya que sí!

A mi primera Alma Mater, la Universidad Veracruzana, gracias por dejar abrir muchas puertas...

Pero sobre todo...

A ti Universidad Nacional Autónoma de México que me has ayudado (y lo sigue haciendo) a acendrar mis virtudes y a redimir de las complejidades que tanto me habían aquejado. Me has marcado para siempre. Has hecho que mis pensamientos y acciones estén emancipados y que se esgriman del conocimiento y la razón para el logro de todos mis objetivos. Te prometo no decepcionarte y perfeccionar, aplicar, transmitir y divulgar mis conocimientos adquiridos en tu recinto. Gracias UNAM, ¡México, Pumas, Universidad!...



ÍNDICE

Resumen	i
<i>Abstract</i>	ii
Abreviaturas	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Características generales de los patógenos	1
I.1.1 Genero <i>Coronavirus</i>	1
I.1.2 Ciclo biológico de los coronavirus	2
I.2 Virus de bronquitis infecciosa	4
I.2.1 La bronquitis infecciosa	4
I.2.2 Características generales del virus	4
I.2.3 Serotipos mundiales y mexicanos	5
I.2.4 Características estructurales del virus de bronquitis infecciosa	5
I.2.5 Métodos de diagnóstico y vacunas actuales	7
I.3 Virus del síndrome respiratorio agudo severo	9
I.3.1 Descubrimiento del virus	9
I.3.2 Síndrome respiratorio agudo severo	10
I.3.3 Taxonomía y morfología de SARS-CoV	11
I.3.4 Características del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo	11
I.3.5 Análisis filogenético: origen del virus SARS	13
I.3.6 Tratamiento y vacunas	15
I.4 La subunidad 1 de <i>Spike</i>: principal inductora de anticuerpos en IBV y SARS-CoV	16
I.4.1 Características generales de la glicoproteína <i>Spike</i> en coronavirus	16
I.4.2 La importancia de la subunidad 1 de IBV y SARS-CoV	17
I.5 <i>Phage display</i>: determinación de epítomos inmunodominantes	22
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS GENERALES	26
V. OBJETIVOS PARTICULARES	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VI.1 Animales de experimentación	27
VI.2 Antígenos utilizados para la inoculación y pruebas de ELISA	27
VI.2.1 Virus	27
VI.2.2 Péptidos sintéticos	28

VI.3 Suero de aves y conejos inoculados con IBV	28
VI.3.1 Inoculación de cepas víricas y péptidos sintéticos a aves y conejos y obtención de suero inmune	28
VI.3.2 Evaluación de la reactividad de los sueros policlonales contra virus y péptidos	29
VI.3.3 Purificación de proteínas	29
VI.4 Selección de clonas de fago por anticuerpos de aves y conejos	30
VI.4.1 <i>Biopanning</i>	30
VI.4.2 Amplificación y caracterización de las clonas individuales	31
VI.5 Utilización de mimótopos como inmunógenos	32
VI.5.1 Mimótopos de la secuencia HVR de S1	32
VI.5.2 Mimótopos de la secuencia <i>Spike</i> de IBV: ensayo de protección	32
VI.6 Métodos computacionales	33
VII. RESULTADOS	34
VII.1 Resultado I. Caracterización de los epítomos inmunodominantes de <i>Spike</i> a través de <i>phage display</i>	34
VII.1.1 Evaluación de la reactividad de sueros de animales inoculados con virus UNAM 2001 y Mass	34
VII.1.2 Evaluación de la reactividad de sueros animales inoculados con péptidos sintéticos	35
VII.1.2.1 ELISA de antisueros de aves inoculadas con virus Mass y UNAM 2001 contra péptidos sintéticos	37
VII.1.3 Purificación de inmunoglobulinas	38
VII.1.3.1 Inmunoglobulinas Y anti-Mass de aves	38
VII.1.3.2 Inmunoglobulinas G anti-UNAM 2001 de conejos	39
VII.1.3.3 Inmunoglobulinas G anti-P138 de conejos	40
VII.1.4 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas en el <i>biopanning</i>	41
VII.1.4.1 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas antivirales de aves	41
VII.1.4.2 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas antivirales de conejos	42
VII.1.4.3 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas anti-P138 de conejos	42
VII.1.5 Inmunogenicidad de todos los mimótopos seleccionados por anticuerpos de péptidos y virus	44
VII.1.5.1 Mimótopos de P138 como inmunógenos	44
VII.1.5.2 Mimótopos de epítomos de virus como inmunógenos: Ensayo de protección	45
VII.1.6 Localización de epítomos inmunodominantes en la secuencia de S1 de <i>Spike</i>	48
VII.2 Resultado II: Análisis comparativo entre epítomos inmunodominantes de la subunidad 1 de IBV y de SARS-CoV	50

VII.2.1	Comparación del dominio inmunodominante de S1 de IBV encontrado por <i>phage display</i> con epítomos de S1 de SARS-CoV	50
VII.2.2	Análisis de la estructura tridimensional del sitio inmunodominante de IBV	51
VII.2.3	Comparación del dominio de unión al receptor de SARS-CoV y la secuencia de carboxilo terminal de S1 de IBV	54
VIII.	DISCUSIÓN	57
IX.	CONCLUSIONES	66
X.	PERSPECTIVAS	68
	ANEXOS	69
	ANEXO I	69
	ANEXO II	75
	ANEXO III	76
	BIBLIOGRAFÍA	77

RESUMEN

El virus de bronquitis infecciosa (IBV) es un coronavirus que se replica en el epitelio del tracto respiratorio, digestivo y urogenital de aves de corral por lo que ha provocado grandes pérdidas económicas a la industria aviar. La glicoproteína superficial *Spike* de IBV es altamente inmunogénica, principalmente gracias a su subunidad 1 (S1). La parte media de S1 presenta una región hipervariable (HVR) con residuos críticos que favorecen la variabilidad genotípica de los virus y contribuyen a producir una respuesta inmune protectora.

En el presente estudio se utilizó la metodología de desplegamiento en fago (*phage display*) para realizar la detección de epítomos inmunodominantes de S1. Los anticuerpos de conejos y aves, inoculados con péptidos sintéticos (secuencia parcial de HVR) y cepas virales, seleccionaron péptidos miméticos (mimótopos) de una biblioteca combinatoria de 12 residuos. Los motivos QxTGPLx_F, QYGKF y YPxYxxL (x representó aminoácidos variables) resultaron ser mimótopos de un clúster de dos epítomos de la región C-ter de HVR de S1 del coronavirus. Mediante la inoculación de algunos mimótopos como inmunógenos en ratones y aves, se obtuvieron sueros inmunes que reconocieron a IBV. Asimismo, en el ensayo de protección en donde las aves fueron desafiadas con el virus UNAM 2001 (de distribución exclusiva en México), los mimótopos de clonas individuales protegieron en un 75% evitando que se desarrollara nefritis o neumonía intersticial. Por otro lado, para caracterizar mejor la probable estructura de este clúster inmunogénico, se realizó un análisis comparativo del perfil hidrofílico y antigénico y de la estructura tridimensional de S1 ya caracterizada en el coronavirus humano del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV). Los resultados de dicho análisis sugirieron que los dos epítomos inmunodominantes se encuentran opuestos uno del otro y, como clúster, presentan una estructura conformacional expuesta en la superficie de la proteína.

La utilización de los mimótopos inmunogénicos obtenidos en el presente trabajo, nos permitió identificar y caracterizar estructural e inmunológicamente algunos epítomos de la proteína *Spike* de IBV. Estos péptidos miméticos de fagos podrían utilizarse en el desarrollo de una nueva generación de vacunas o pruebas de diagnóstico de IBV, en especial, de cepas endémicas mexicanas.

ABSTRACT

Infectious bronchitis virus (IBV) is a coronavirus that replicates in the epithelium of respiratory, digestive and uro-genital track tissues of chickens causing economical losses in the poultry industry. The IBV glycoprotein Spike (as in other coronaviruses) is highly immunogenic due to the bulbous surface-exposed subunit 1 (S1). The amino-terminal half-part of S1 presents a hypervariable region (HVR) with important residues that lead viral genetic variability and contributes to induce a protecting immune response.

The purpose of this research was to identify and characterize S1 immunodominant epitope by phage display methodology. Rabbit and chicken sera obtained by inoculating synthetic peptides (HVR partial sequence) and virus strains selected mimetic peptides (mimotopes) of a 12-mers random library. The motifs QxTGPLxF, QYGKF y YPxYxxL (where x depicted a non-epitope random amino acid) were the mimotopes of a two-epitope cluster found in S1 HVR C-terminus. Some mimotopes used as immunogens in mice and chickens induced antibodies that recognized to IBV. In the challenge assay, 75% of chicken population that was immunized with such single phage mimotopes did not develop nephritis or interstitial pneumonia. On the other hand, with the purpose of characterizing a little more this immunodominant cluster, a probable 3D structure was deduced through hydrophobicity-antigenicity profiles and SARS virus S1-structure comparisons. It is suggested that the two immunodominant epitopes are found face to face presenting, as a cluster, a conformational structure exposed in the protein surface.

The immunogenic mimotopes obtained lead to identify and characterize structurally and immunogenically some S1 epitopes of the IBV Spike protein. These phage mimetic peptides could be used as a novel vaccine or a diagnostic strategy to detect IBV, specially, Mexican strains.

ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia

ACE-2: enzima convertidora de angiotensina (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*)

Conn: cepa Connecticut

C-ter: carboxilo terminal

E: proteína de envoltura (*Envelope protein*)

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

FIPV: virus de la peritonitis felina (*Feline Infectious Peritonitis Virus*)

HCoV: coronavirus humano (*Human Coronavirus*)

HE: hemaglutinina esterasa (*Haemagglutinin-Esterase*)

HVR: región altamente variable (*Hypervariable Region*)

IBV: virus de bronquitis infecciosa (*Infectious Bronchitis Virus*)

ICTV: Comité Internacional sobre la Taxonomía de Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IgG: inmunoglobulina G

IgY: inmunoglobulina Y

kDa: kilodaltones

kpb: kilopares de bases

M: proteína de membrana (*Membrane protein*)

Mass: cepa Massachusetts

MVH: virus de la hepatitis murina (*Murine Hepatitis Virus*)

N: nucleoproteína (*Nucleoprotein*)

N-ter: amino terminal

OMS: Organización Mundial de la Salud

P138: péptido 138

PBS: amortiguador de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*)

PDB: base de datos de proteínas (*Protein Data Bank*)

PEDV: virus de la diarrea epidémica (*Porcine Epidemic Diarrhea Virus*)

RBD: dominio de unión al receptor (*Receptor Binding Domain*)

RBM: motivo de unión al receptor (*Receptor-Binding Motif*)

SARS: síndrome respiratorio agudo severo (*Severe Acute Respiratory Syndrome*)

SARS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*)

TGEV: virus de la gastroenteritis transmisible porcina (*Transmissible Gastroenteritis Virus*)

ufp: unidades formadoras de placa

INTRODUCCIÓN

I.1 Características generales de los patógenos

I.1.1 Género *Coronavirus*

El virus de bronquitis infecciosa (IBV) y el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) forman parte del género *Coronavirus* (Thiel, 2007) que se incluyen en la familia *Coronaviridae* y el orden Nidovirales (Tabla 1). Los coronavirus se caracterizan porque infectan aves (aves de corral y faisanes, principalmente) y mamíferos (murciélagos, ratas, ratones, conejos, perros, gatos, caballos, cerdos, ganado y el ser humano) causándoles diferentes patologías como infecciones respiratorias, digestivas, cardiovasculares y neurológicas. Lo anterior es causa de enormes pérdidas económicas en la industria de productos lácteos y cárnicos y huevos provenientes de granjas, así como la incesante aparición de enfermedades respiratorias durante todo el año en humanos.

Grupo 1	Subgrupo 1 ^a	Virus de la gastroenteritis transmisible porcina Virus entérico canino Virus de la peritonitis infecciosa felina
	Subgrupo 1b	Virus de la diarrea epidémica porcina Virus humano 229E Virus de murciélago
Grupo 2	Subgrupo 2 ^a	Virus de la hepatitis murina Virus humano OC43 Virus bovino Virus respiratorio canino Virus encefalomiелitis porcina Virus puffinosis
	Subgrupo 2b	Virus SARS
Grupo 3		Virus de la bronquitis infecciosa Virus de pavo Virus de faisán Virus de pato Virus de ganso Virus de paloma
* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, ICTV, 2004)		

Los coronavirus son virus envueltos y su genoma es el más grande dentro de los virus constituidos de ARN ya que oscila entre los 16 y 33 kilopares de bases (kpb) y es altamente infeccioso replicándose en

el citoplasma celular. El ARN de los coronavirus es de una sola cadena con sentido positivo y de forma helicoidal, por lo cual, se clasifican en el Grupo IV de la clasificación de Baltimore (Thiel, 2007). El ARN 5' está cap metilado, mientras que 3' presenta una cola de poliadenina (regiones que no se traduce, UTRs), lo que permite que se una al ribosoma para la traducción. Todos los coronavirus se caracterizan porque presentan cuatro proteínas estructurales. La glicoproteína *Spike* presenta una forma bulbosa (peplómero) con un peso molecular aproximado de 180-220 kilodaltones (kDa). *Spike* es altamente inmunogénica y con una tasa de variabilidad genética alta, además de ser una determinante del tropismo celular. La proteína de envoltura (E) tiene un peso molecular de 10-12 kDa aprox., es altamente hidrofóbica y sirve como envoltura protectora del virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV) y de IBV. La glicoproteína transmembranal (M) de 30-35 kDa aprox. es importante para el ensamblaje del virus, mientras que la nucleoproteína (N) de 45-50 kDa, que presenta una forma cilíndrica y helicoidal, envuelve al material genético. En algunos coronavirus del grupo 2a existe la hemaglutinina-esterasa (HE) de 140 kDa aprox., uniéndose a un correceptor celular (por lo general, N-acetil neuramínico) (Talbot and Levy, 1995; Cavanagh, 1981, 1983, 2007; Corse and Machamer, 2000). Las proteínas no estructurales (accesorias) de bajo peso molecular, son también utilizadas por los taxónomos para determinar el subgrupo al que pertenecen algunos coronavirus, sin embargo, aún se desconoce su función dentro del genoma viral (Cavanagh, 2005).

1.1.2 Ciclo biológico de los coronavirus

El estudio de la replicación del genoma viral se ha basado en el modelo del virus murino (MHV) y actualmente, el del virus SARS (Fig. 1). Ambos virus se unen a receptores celulares (proteína antigénica carcino-embriónica y enzima convertidora de angiotensina 2, respectivamente) a través de su proteína *Spike*, no obstante, se desconoce si el mecanismo de entrada es mediante fusión membranal o por endocitosis (Blau and Holmes, 2001). Los marcos de lectura abierto, 1a y 1b, se traducen en pp1a (una proteasa) y pp1ab (una ARN polimerasa dependiente de ARN y una helicasa). Ambas proteínas son subunidades del complejo replicasa. Este complejo sintetizará un ARN de cadena negativa complementario al ARN genómico (Knipe and Howley, 2001). Este ARN servirá para sintetizar, a través de transcripción discontinua (la cual no ha sido bien estudiada), ARN's mensajeros subgenómicos de cadena positiva de forma anidada (*nested transcripts*) y una cadena larga de ARN, todos compartiendo el mismo 3' terminal, pero cada uno empieza con un 5' terminal diferente por lo que el primer gen de cada ARNm traducirá a proteína, excepto la cadena más larga de ARN que formará parte del material genético de la próxima generación viral. La nucleoproteína (N) se une al ARN genómico para formar la nucleocápside, mientras que la proteína membranal (M) es integrada en la membrana del retículo endoplásmico, así como la proteína *Spike* y la hemaglutinina esterasa. Después de la unión de las proteínas a la membrana, la nucleocápside con el ARN de forma helicoidal se encapsula en el lumen del retículo endoplásmico. Al

final, la nueva progenie viral es transportada a través de vesículas en el aparato de Golgi hacia la membrana celular y son exocitadas en el espacio extracelular (Weiss S and Navas S, 2005).

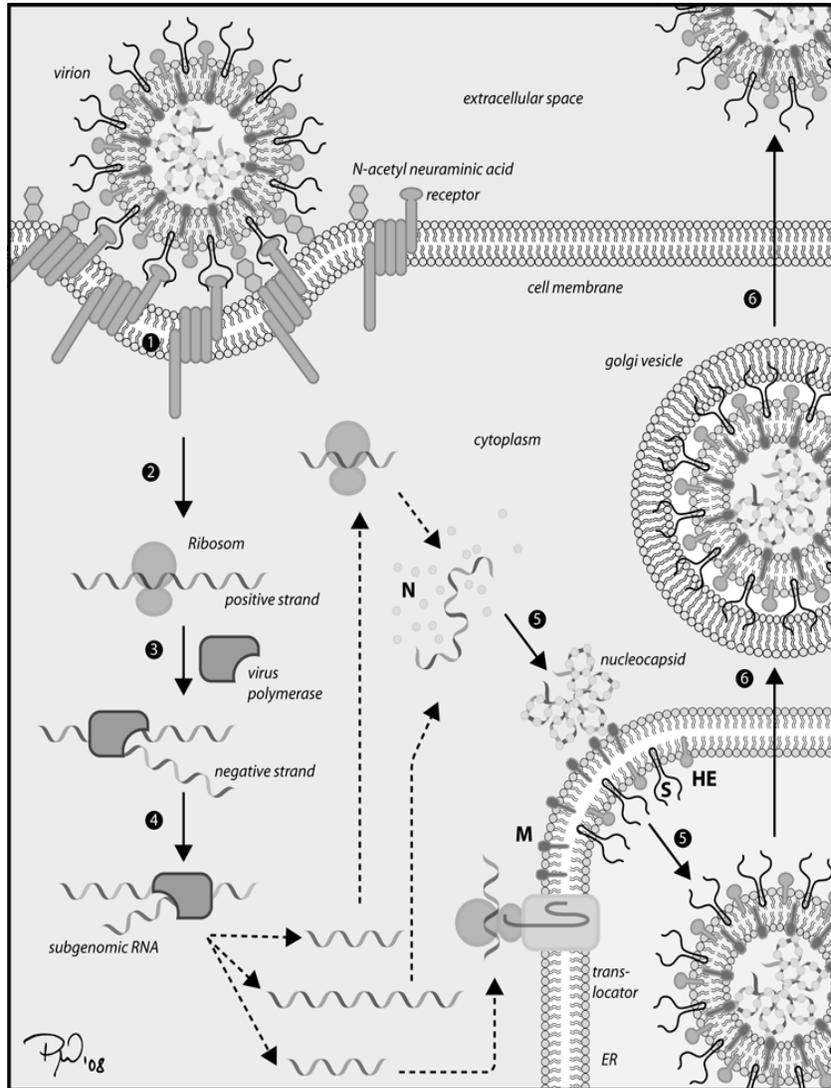


Fig. 1 Replicación de un coronavirus. (1) Entrada del virus a través de su receptor de superficie, Spike uniéndose a un receptor celular. (2) El virus podría entrar a la célula mediante fusión membranal o por endocitosis. (3) El complejo replicasa (polimerasa) se traduce. (4) Se transcriben pequeños ARN subgenómicos de cadena positiva que serán usados para sintetizar las proteínas estructurales y el ARN genómico de cadena positiva. (5) La nucleoproteína (N) se une al ARN genómico (nucleocápside) y Spike, la proteína transmembranal (M) y la hemaglutinina esterasa (HE) se integran al retículo endoplásmico (ER) para (6) formar una vesícula que será transportada a la membrana celular.

I.2 Virus de bronquitis infecciosa

I.2.1 La bronquitis infecciosa

IBV es un patógeno que ha causado grandes pérdidas económicas en la industria aviar alrededor del mundo provocando una enfermedad altamente contagiosa entre aves de corral (*Gallus gallus domesticus*) (Cavanagh and Naqui, 2003). Este virus causa infecciones en órganos que presentan superficies epiteliales, tales como el tracto respiratorio y reproductivo (Collisson *et al*, 1992 y Cavanagh D, 2005) y en el riñón (Wang *et al*, 1993; Cook J, 1984; Julian R and Willis N, 1969). La infección disminuye la calidad y la producción del huevo (afecta la consistencia y el pigmento de la cáscara), inhibe la reproducción aviar (el oviducto es afectado) y produce la muerte hasta de un 50% en aves jóvenes (Matthijs *et al*, 2003; Ladman and Feberwee, 2004). En general, existen lesiones en la parte superior del tracto respiratorio, airsacculitis, nefritis (por cepas nefrotrópicas), depósitos de urato en riñón y uréteres (Butcher *et al*, 2002). El virus tarda en replicarse de 36 a 48 hrs dentro de su organismo hospedero manifestándose en forma de exudado nasal, estornudos, ojos vidriosos, estado letárgico, chillidos quejumbrosos, diarrea, deshidratación, neumonía aguda, depresión, infecciones secundarias (*Escherichia coli* y micoplasmas) y hasta muerte (McFerran and McNulty, 1993).

I.2.2 Características generales del virus

El virus de bronquitis infecciosa fue descrito por primera vez en 1931 por Schalk y Hawn en una localidad de Massachussets, EU y aislado en 1937 por Hudson y Beaudette (McFerran and McNulty, 1993). Este virus es de distribución mundial infectando aves domésticas de cualquier edad, por lo regular, en meses fríos (Butcher *et al*, 2002). IBV no se transmite a través de vectores sino que sobrevive en aerosol (al toser o estornudar las aves) durante varios días a bajas temperaturas. No ocurre la transmisión por huevo (McFerran and McNulty, 1993). Este virus se caracteriza por tener una forma pleomórfica, con un diámetro entre 80-200nm; formado por proyecciones en forma de bate que miden de 17 a 20nm del largo (Fig. 2) (Cavanagh D, 2007). Además, es sensible al éter; sobrevive en agua (lo cual es importante para la administración de vacunas); tiene una estabilidad óptima en un pH de 7.8, pero

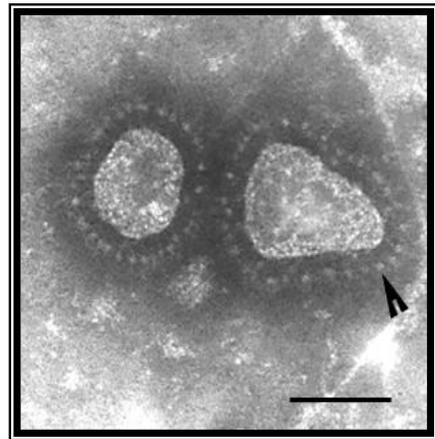


Fig. 2 Virus de bronquitis infecciosa extraído de heces fecales de un ave joven. Tomado de Steffens, WL, 1998)

puede sobrevivir entre pH 2 a 9. Es sensible al tratamiento con calor, solventes lipídicos, detergentes no iónicos, formaldehído y agentes oxidantes. Puede permanecer por meses a -20°C en líquido alantoideo e indefinidamente a temperaturas más bajas (McFerran and McNalty, 1993).

1.2.3 Serotipos mundiales y mexicanos

Desde la primera cepa de IBV caracterizada, Mass41 (Schalk and Hawn, 1931), se han descrito más de 30 serotipos con diferente tipo de virulencia y tropismo. Así, existen serotipos que atacan severa y exclusivamente al tracto respiratorio (Mass, Conn, Ark, GA98) como otras que son fielmente nefrotropicos (Gray, Holte, cepas australianas e italianas) (Parr and Collison, 1993). De acuerdo a Cavanagh, 2005, serotipos IBV han aumentado en los últimos años, en algunos casos, debido a una separación evolutiva con respecto al aislamiento geográfico como en el caso de cepas australianas principalmente (Ignjatovic *et al*, 2006); asimismo, han ocurrido nuevos brotes en Jordania (Gharaibeh, 2006), Polonia (Domanska and Blicharz *et al*, 2006), Italia (Bochkov *et al*, 2006), Rusia (Botchenko *et al*, 2006), Escocia (Worthington and Jones, 2006), Colombia (Alvarado *et al*, 2005), China (Liu *et al*, 2006), Japón (Mase *et al*, 2004), Taiwan (Wang and Huang, 2000) en donde las nuevas variantes ni siquiera tienen parentesco genómico con los grupos clásicos. Esta especificidad geográfica puede ser debida a la lenta evolución que existe entre algunas variantes (Schikora *et al*, 2003), aunque otras se han distribuido ampliamente en el resto del mundo (Mass, Ark, Conn, DE) (Jackwood *et al*, 2005). La evolución del IBV ocurrida entre diferentes zonas a nivel mundial, particularmente en donde existen grandes concentraciones de granjas aviares, se le ha atribuido debido a la gran variabilidad en el genoma, el constante uso indiscriminado de vacunas múltiples activas, la habilidad de replicarse en muchos tejidos, las recombinaciones entre cepas y a la presión inmunológica aviar (Bochkov *et al*, 2006; Wang *et al*, 1993; Cavanagh *et al*, 1997).

En México, también se ha detectado este tropismo geográfico debido a que existen variantes endémicas distribuidas principalmente en el centro del país. Las de mayor importancia son Mex/1765/99 o también conocido como UNAM 97 (Gelb *et al*, 2001) que es una cepa pneumotrópica y BL56 (Escorcia *et al*, 2000) y UNAM 2001 (Escorcia, 1999; Gazarian *et al*, no publicado) que pueden infectar riñones de aves (aunque también producen neumonía). Es importante recalcar que México no cuenta con sus propios sistemas de diagnóstico y mucho menos, con vacunas específicas para estos serotipos endémicos valiéndose de vacunas comerciales importadas a base de serotipos de distribución mundial (Mass y Conn, principalmente) que no presentan reactividad inmunológica cruzada (Escorcia, 1999).

1.2.4 Características estructurales del virus de bronquitis infecciosa

El genoma de IBV tiene un ARN infeccioso de cadena sencilla positiva de 27.5 kpb (Fig. 3). Este ARN codifica para cuatro proteínas estructurales: *Spike*, M, E y N. La glicoproteína *Spike*, de un peso

molecular de 180 kDa y 1154 aminoácidos, es la responsable de la unión entre IBV y la célula epitelial hospedera, además de ser la promotora de la probable fusión celular o de la endocitosis para la entrada del virus a la célula. Se ha visto que en varios coronavirus, esta glicoproteína es la determinante del tipo de hospedero así como de la patogenicidad (Hajjema *et al*, 2004). Sin embargo, en el caso de IBV, *Spike* es un determinante del tropismo celular, pero no necesariamente de la patogenicidad como pudo observarse al reemplazar el gen de *Spike* de una cepa no patogénica de IBV (Beaudette) con el de la cepa patogénica Mass41 (M41) causando que la primera no pudiese unirse a las células Vero *in vitro* (Casais *et al*, 2003). Cuando se inoculó (vía intranasal y ocular) el virus recombinante en aves, éste seguía siendo no patogénico, aunque sí estimulaba una respuesta inmune protectora contra el virus M41 (Hodgson *et al*, 2004). La glicoproteína M de IBV tiene 25 kDa y 225 aminoácidos y permite la expansión de la membrana durante el ensamblaje. La proteína E tiene apenas un peso molecular de 12.2 kDa y 108 aminoácidos y actúa como una envoltura protectora. La proteína N (45 kDa y 409 aminoácidos) proporciona protección al ARN genómico formando una nucleocápside (Cavanagh D, 2005). El orden de los genes de las proteínas estructurales en el genoma es el mismo en todos los coronavirus (Fig. 3). Además de las proteínas estructurales, el genoma de IBV (como en todos los coronavirus) codifica genes de proteínas no estructurales. Tal es el caso de los genes para la replicasa que traducen para un complejo proteínico multifuncional ya que puede realizar la transcripción del ARN genómico, actuar como el ARN líder y presenta actividad proteasa y helicasa. Los genes 3 y 5 traducen las proteínas no estructurales 3a (6.6 kDa y 57 aminoácidos) y 3b (7.4 kDa y 64 aminoácidos), 5a (7.5 kDa y 65 aminoácidos) y 5b (9.3 kDa y 82 aminoácidos), respectivamente, y aún se desconoce su función en cualquier coronavirus (Cavanagh D, 2005).

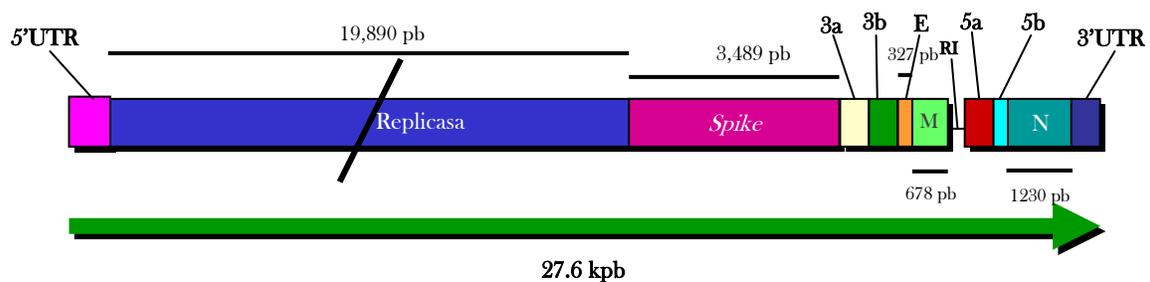


Fig. 3 Organización del genoma de IBV. El gen 1 codifica para la proteína replicasa que ocupa dos terceras parte del genoma. El genoma está delimitado por dos regiones no traducidas (UTR) que conforman la región 5' cap-metilado y 3' poli (A). La familia Coronaviridae presenta genes monocistrónicos que codifican para las proteínas estructurales Spike, E, M y N, así como una región intrónica (RI) El género Coronavirus principalmente difiere entre sus especies por sus proteínas no estructurales 3a, 3b y 5a, 5b. La organización del genoma es igual entre todos los coronavirus.

1.2.5 Métodos de diagnóstico y vacunas actuales

Es importante recalcar que para dar un diagnóstico a través de los signos clínicos de la bronquitis es muy difícil puesto que los signos respiratorios de esta enfermedad son similares a la enfermedad de Newcastle, laringotraqueitis infecciosa o infecciones por pneumovirus, así mismo, el decremento de la producción de huevos y la pobre calidad de los mismos, no es un factor que contribuye al diagnóstico de IBV (Villegas, 1998). Por lo tanto, es necesario hacer pruebas en el laboratorio que permitan el aislamiento e identificación del agente causal. Esto se hace a través de pruebas serológicas y genotípicas una vez aislado el patógeno de exudados nasales, del tracto respiratorio, pulmones, hígado, oviducto, intestino, amígdalas o heces fecales. Para titular el virus se utiliza cultivo de células de tráquea de embriones de pollo libres de patógenos específicos hasta observar efectos citopáticos (Cavanagh and Naqui, 1997). Para poder determinar el serotipo de los virus, se utilizan métodos serológicos como la neutralización viral (Darbyshire *et al*, 1978), ELISA y EIA (Mockett and Darbyshire, 1981), inhibición de la hemaglutinina (Alexander *et al*, 1983), en los cuales, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales (Ignjatovic *et al*, 1991) o por métodos moleculares como RFLPs (Cavanagh *et al*, 1992) y RT-PCR (Kingham *et al*, 2000) y RT-PCR en tiempo real (Jackwood *et al*, 2003) a través de secuencias parciales de la glicoproteína *Spike* (subunidad 1).

Con respecto a la vacunación contra IBV, se ha venido manteniendo desde los años 50's de forma masiva. Estas vacunas son administradas dependiendo del serotipo y del tipo de ave infectada (pollos de engorda, aves reproductoras o ponedoras). Los pollos de engorda son inmunizados preferentemente con vacuna viva debido a su corto tiempo de estancia en las granjas avícolas (antes de venderse al consumidor), mientras que las gallinas ponedoras y reproductoras se les suministra una dosis de vacuna activa en la primera inmunización y una vacuna inactivada en los refuerzos para tener un espectro de protección mayor ya que contiene adyuvantes e inmunoestimulantes. Las vacunas vivas se inoculan directamente en el ojo por aspersión o se vierten en los bebederos de las aves, mientras que las vacunas inactivadas se recomiendan inocularse intramuscularmente en el muslo o en el pecho, así como subcutáneamente en el tercio inferior del cuello (Intervet y Engormix, 2006).

El uso de vacunas vivas atenuadas, a base del serotipo Massachusetts (M41, H120, Conn) que se distribuye mundialmente, es muy común en la industria y granjas aviares. También se han utilizado vacunas heterólogas vivas (mezcla de serotipos mundiales con algunas variantes europeas o australianas) con resultados en los que no se ha reducido la mortalidad aviar provocada por el virus (Cook *et al*, 1976 and Cook *et al*, 1999; Cavanagh, 2003). Esto ha indicado que no se induce una respuesta inmunológica de protección cruzada de cepas vacunales con respecto de serotipos endémicos y, asimismo, estas vacunas han promovido el surgimiento de nuevas variantes virales debido a mutaciones secundarias que revierten la virulencia (Mase *et al*, 2004; Cavanagh and Naqui, 2003; Farsang *et al*, 2002; Sapats *et al*, 1996). Además, se ha reportado que estas vacunas pueden provocar lesiones en el epitelio de la tráquea causando infecciones

bacterianas secundarias (Tarpei *et al*, 2006). Las vacunas elaboradas con virus inactivados ofrecen poca protección (entre un 20 y un 40%) y deben ser suministradas en varias dosis, por lo que, como se dijo anteriormente, se deben combinar con una vacuna viva para mayor protección, pero aún así, depende del tipo de serotipo inoculado (Cook *et al*, 1999), de su tropismo celular (Pensaert M and Lambrechts C, 1994), de su grado de virulencia, e incluso, de la raza del ave (Cavanagh *et al*, 2005).

En la actualidad, países en vías de desarrollo como México, continúan utilizando vacunas importadas a base de cepas como Mass, Ark o Conn a pesar de que existen virus endémicos como BL56, UNAM 97 y UNAM 2001 (Escorcia MS, 1999). Las empresas farmacéuticas veterinarias en México (Avimex® e Intervet México®) no se han dedicado a hacer investigación sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de aves infectadas con virus endémicos.

Es necesario tomar en cuenta los riesgos que se generan por utilizar vacunas vivas, las desventajas de utilizar vacunas inactivadas o la relativa protección de la combinación de ambas. Es por ello que actualmente se han estado realizando investigaciones en la proteína antigénica *Spike* (Cavanagh, 2005). Los distintos análisis filogenéticos han demostrado que genes de la subunidad 1 de *Spike* de variantes víricas aislados de aves vacunadas en África, Asia, Europa, América Central y Suramérica, el Medio Oriente y Estados Unidos comparten por lo menos del 75 al 99% de aminoácidos (Cavanagh *et al*, 1992 y 1988). Esta variación es la involucrada en la poca protección cruzada pues tan solo basta entre un 3 y un 5% de variación en los aminoácidos de S1 (está formado por 520 aminoácidos aproximadamente) para que las aves no puedan tener protección inmunológica (Cavanagh D, 2005).

I.3 Virus del síndrome respiratorio agudo severo

I.3.1 Descubrimiento del virus

El síndrome respiratorio agudo severo (SARS, por sus siglas en inglés) apareció por vez primera a mediados de noviembre de 2002 en Guandong, China, y para finales de febrero de 2003, la pandemia ocurrió. El virus rápidamente se dispersó a 29 países demostrando su potencial para transmitirse rápidamente entre humanos puesto que lo hace a través de aerosol y fluidos corporales (WHO, 2007). Para Abril, 2003, la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció que se trataba de un nuevo virus. El virus fue identificado como un coronavirus que, filogenéticamente, lo posicionaba entre el grupo 2 (coronavirus de ratón y bovino) y 3 (coronavirus aviar) de la familia *Coronaviridae* (Drosten *et al*, 2003).

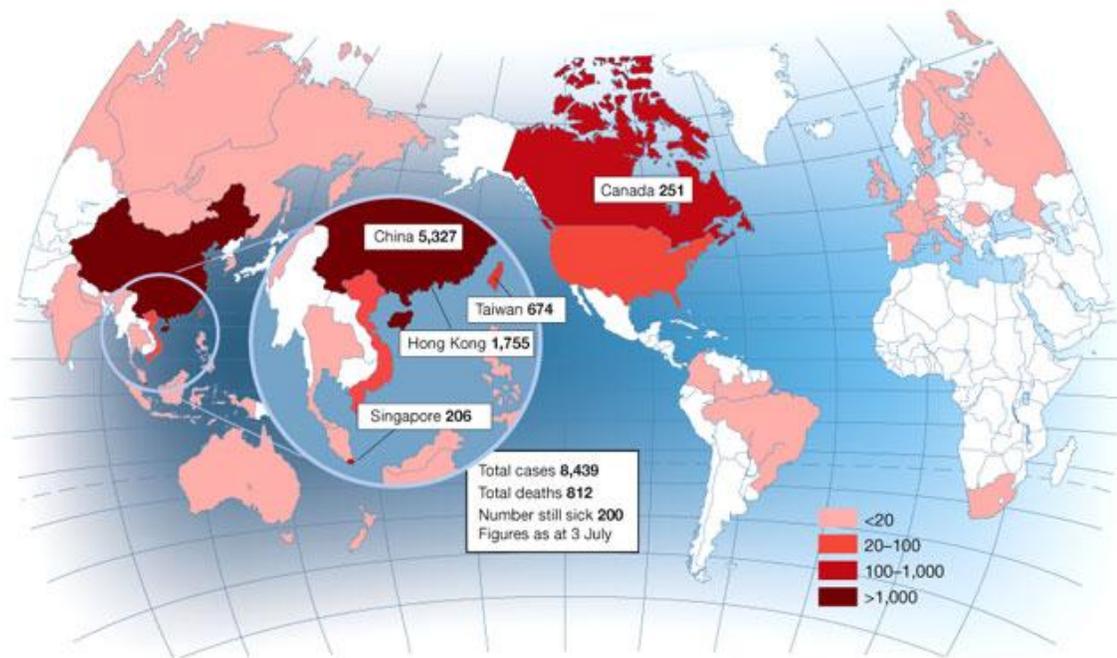


Fig. 4 Más de 8 mil casos presentados alrededor del mundo debido a infecciones por el síndrome respiratorio agudo severo. Tomado de WHO, 2007.

El 18 de mayo de 2004 se presentó el último caso de esta enfermedad en China. Hasta esta fecha, el coronavirus cobró 812 muertes y 8439 casos (Fig. 4) en todo el mundo (WHO, 2007). China fue el país más afectado con más de 5000 casos de infección y más de 300 muertes (mortalidad del 6.6%) seguido de Hong Kong con 1700 personas infectadas y 300 fallecimientos (mortalidad del 17%).

El costo económico fue extremadamente caro. Entre una búsqueda de una posible vacuna, utilización masiva de hospitales, viajes cancelados al Sureste de Asia y, sobre todo, el decremento de las inversiones en esta región del mundo tuvo un costo aproximado de \$100 millones de dólares de acuerdo a *Bio Economic Research Associates* en Cambridge, Massachusetts (BIO-ERA, 2007).

1.3.2 Síndrome respiratorio agudo severo

El SARS es una enfermedad crónica respiratoria (pneumonía atípica) que se caracteriza principalmente por un daño alveolar difuso (Ding *et al*, 2003). Los principales síntomas del paciente son parecidos a la influenza (Booth *et al*, 2003): fiebre (38 °C), disnea, linfopenia, tos seca, infección en la parte baja del tracto respiratorio, además, síntomas gastrointestinales y diarrea (Nie *et al*, 2003; Tsui *et al*, 2003; Lee *et al*, 2003). Existe un período de incubación del virus de 2-10 días y puede diferir sintomáticamente dependiendo de la edad. En general, la mortalidad es del 10% (WHO, 2007), pero en pacientes ancianos aumenta al 50% (considérese que la tasa de mortalidad por el virus de influenza es del 0.6% en ancianos aunque aumenta hasta el 33% cuando emergen nuevas variantes).

Para el diagnóstico clínico se ha valido de estudios radiográficos del pecho del paciente mostrando filtrados pulmonares periféricos pudiéndose observar con mayor resolución con estudios de escaneo pulmonar mediante tomografía computarizada (Wong *et al*, 2003; Li *et al*, 2003). Otras pruebas de diagnóstico más precisas han sido aprobadas por la OMS (WHO, 2007). La ELISA es una prueba que detecta anticuerpos de SARS-CoV 21 días después de presenciar los síntomas. El ensayo de inmunofluorescencia permite detectar anticuerpos 10 días después de presentar el síndrome, sin embargo, es una prueba muy laboriosa. La última prueba es la reacción de cadena polimerasa (PCR) que detecta el material genético del virus en muestras de sangre, esputo, tejido y fecales. La PCR, como prueba de diagnóstico del virus SARS, es muy específica, pero no sensitiva (un resultado positivo es un indicador infalible de que el paciente porta el virus, pero un resultado negativo no significa que el paciente no pueda tener SARS).

1.3.3 Taxonomía y morfología de SARS-CoV

El SARS es causado por el agente etiológico SARS-CoV, un coronavirus del subgrupo 2b (Grupo 2) (Véase Tabla 1) de la familia *Coronaviridae* (Orden Nidovirales). Existen aproximadamente 200 variantes de este coronavirus (ICTV, 2004). El virus se caracteriza por presentar, como material genético, un ARN de cadena simple positiva y, además, proteínas estructurales de envoltura (virus envuelto) y una nucleocápside. Su forma es pleomórfica y presenta una especie de corona en su superficie (Fig. 5).

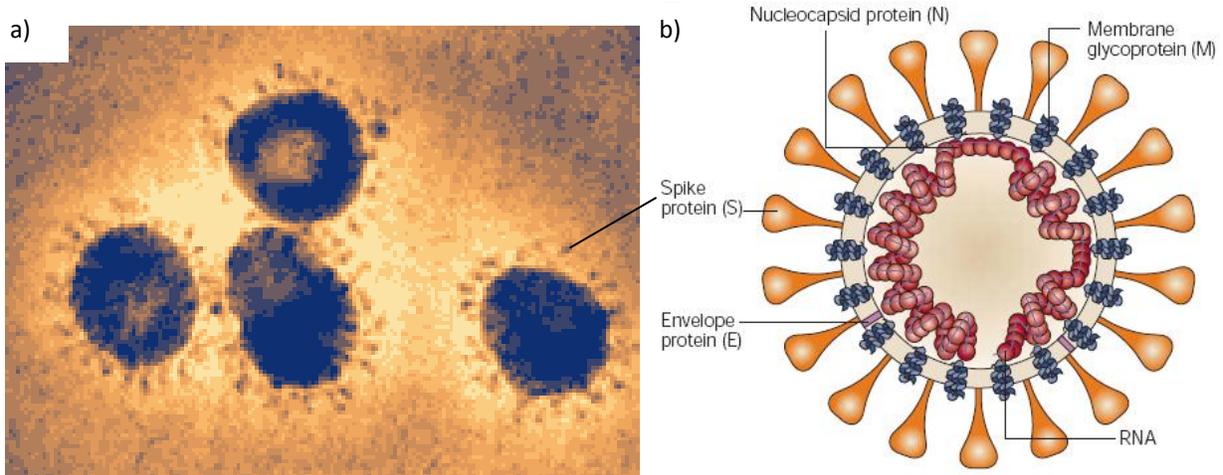


Fig. 5 Morfología del virus SARS. a) micrografía electrónica del virus en donde se aprecia la proteína Spike, característica de la familia *Coronaviridae*. b) representación esquemática de las proteínas estructurales; la proteína Spike se encuentra inmersa en una bicapa lipídica derivada de la membrana intracelular. Las proteínas de membrana y envoltura están en contacto con la nucleocápside, la cual se asocia al material genético. Tomado de Stadler, 2003.

1.3.4 Características estructurales del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo

El tamaño del genoma del coronavirus SARS (SARS-CoV) es de 29.7 kpb. Presenta un ARN poliadenilado con un 41% de nucleótidos de guanina y citosina (Rota *et al*, 2003). El genoma es típico de un coronavirus como se muestra en la Fig. 6. Marra y cols., 2003 secuenciaron el genoma de SARS-CoV identificando genes que codifican para proteínas estructurales: Spike (S), proteína de envoltura (E), de membrana (M) y una nucleocápside (N) y como proteínas no estructurales: Replicasa y nueve marcos de lectura abierto (ORFs) (el grupo de Rota solo identificó 5 ORFs). Dentro de los genes de replicasa, existen dos marcos de lectura abiertos que se traslapan: ORF1a y ORF1b y que conforman las dos terceras partes del genoma (nucleótidos 265-21485). También se codifican proteasas como PLpro (*papain-like cysteine protease*) y 3CLpro (*3C-like cysteine protease*) que dividen a la poliproteína replicasa en polipéptidos individuales que son requeridos en la replicación y transcripción. Aún no se han identificado las funciones biológicas de todos los ORF, además de que la mayoría se han obtenido por análisis de predicción por algoritmos computacionales (Tabla 2).

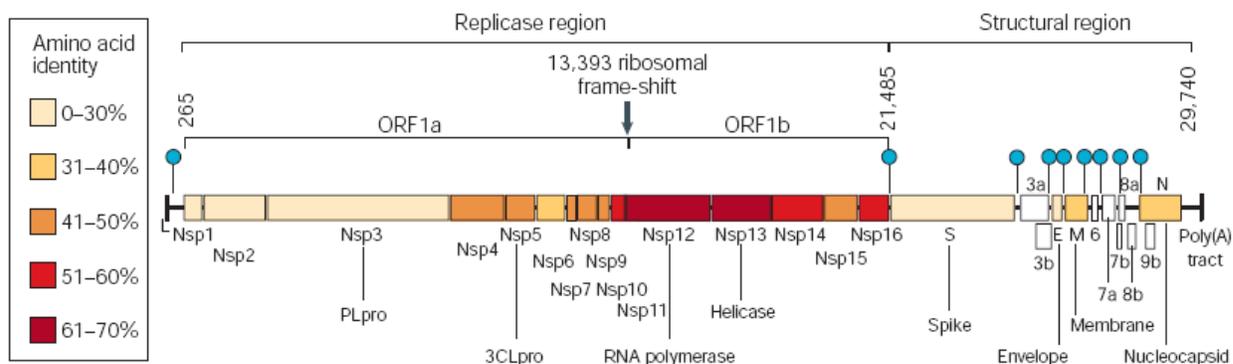


Fig. 6 Estructura del genoma del virus SARS. Se representan las proteínas estructurales y no estructurales (Nsp) representadas por cuadros. Los colores indican el nivel de identidad de los aminoácidos del virus SARS con respecto al de otros coronavirus. Las proteínas accesorias se encuentran en blanco, mientras que las secuencias regulatorias de transcripción se representan en círculos que son específicas para SARS-CoV (5'ACGAAC3'). Asimismo, se muestra la secuencia líder (L) y la cola 3' poli(A).

Tabla 2 Proteínas y predicciones estructurales de SARS-CoV

ORF	Proteínas	Longitud (aa)	Función
REGIÓN REPLICASA			
ORF1a	Nsp1	180	-
	Nsp2	638	-
	Nsp3 (PLpro)	1922	Proteasa de cisteína similar a la papaina. Divide a Nsp1-Nsp4. Presenta dos dominios transmembranales
	Nsp4	500	Contiene tres dominios transmembranales
	Nsp5 (3CLpro)	306	Proteasa de cisteína similar a 3C. Escinde a Nsp4-Nsp16
	Nsp6	290	Contiene cinco dominios transmembranales
	Nsp7	83	-
	Nsp8	198	-
	Nsp9	113	-
	Nsp10	139	Dominio similar al factor de crecimiento
	Nsp11	13	-
ORF1b	Nsp12 (RdRp)	932	Polimerasa dependiente de ARN
	Nsp13 (helicasa)	601	Actividad helicasa. Dominio de unión a zinc; NTPasa
	Nsp14	527	Exonucleasa (homología con ExoN)
	Nsp15	346	endoARNasa (homología con XendoU)
	Nsp16	298	Metiltransferasa en ARNm
REGIÓN ESTRUCTURAL			
ORF2	Spike (S)	1255	Unión y fusión celular. Un dominio transmembranal. Aproximadamente contiene 12 sitios de N-glicosilación
ORF3a	NA	274	Dos dominios transmembranales; un sitio de N-glicosilación y 10 sitios O-glicosilación. Probablemente tiene unión a ATP
ORF3b	NA	154	-
ORF4	Envoltura (E)	76	Envoltura protectora viral y probablemente actúa en la replicación del virus
ORF5	Membrana (M)	221	Formación y expansión de la envoltura viral; se cree que interactúa con N
ORF6	NA	63	Un dominio transmembranal
ORF7a	NA	122	Un dominio transmembranal

Continuación...

Continuación...

ORF7b	NA	44	Un dominio transmembranal.
ORF8a	NA	39	Asociada a membrana. Parece ser una importante diferencia genómica entre el coronavirus SARS del humano y el de la civeta (Guang et al, 2003)
ORF8b	NA	84	Un sitio N-glicosilación. Parece ser una importante diferencia genómica entre el coronavirus SARS del humano y el de la civeta (Guang et al, 2003)
ORF9a	Nucleocápside (N)	422	Unión al ARN genómico
ORF9b	NA	98	Un sitio O-glicosilación

¹ se desconoce la actividad

^{NA} no aplica

Modificado de Marra y cols; Stadler y cols, 2003

1.3.5 Análisis filogenético: el origen del virus SARS

El proteoma de SARS-CoV tiene un parecido del 20-40% entre los tres grupos de coronavirus. Análisis filogenéticos (Fig. 7) indican que las proteínas estructurales y la replicasa agrupan al SARS-CoV en otro grupo monofilético (Rota *et al*, 2003; Marra *et al*, 2003 y Gorbalenya *et al*, 2004):

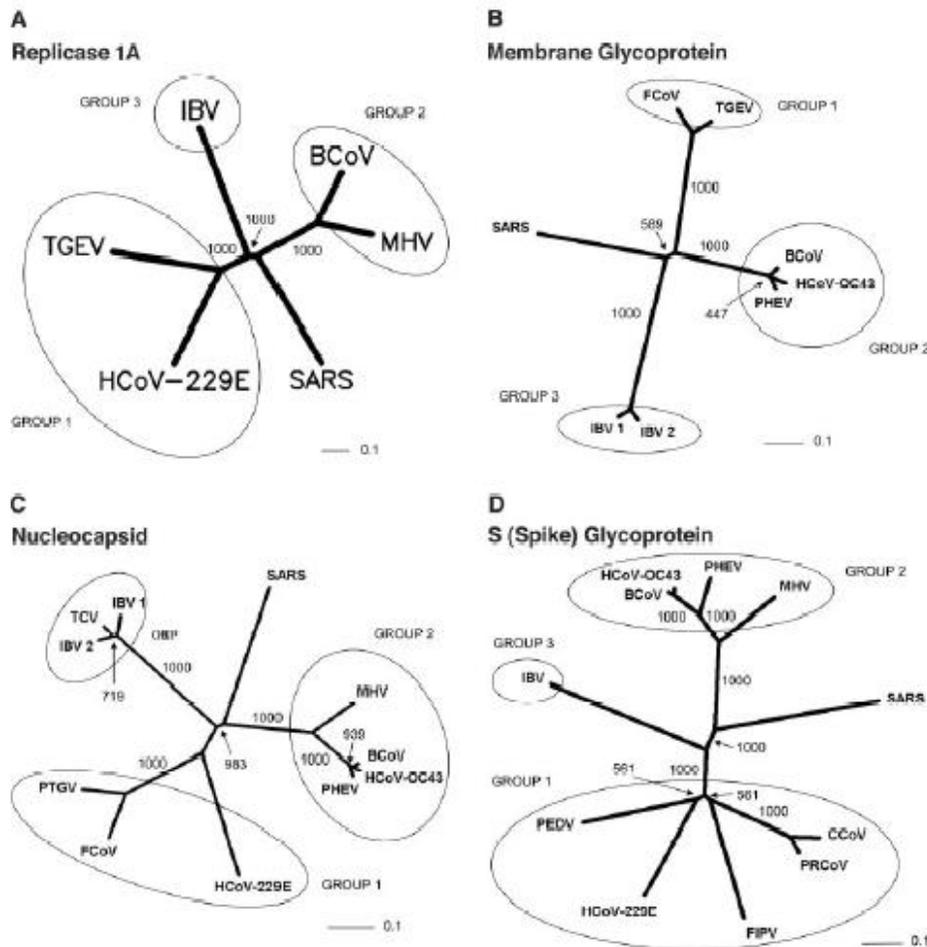


Fig. 7 Árboles filogenéticos de la replicasa y proteínas estructurales M, N y Spike donde se muestra la divergencia genética de coronavirus SARS (Imagen tomada de Marra *et al*, 2003).

Sin embargo, existe una conservación genética entre la polimerasa de los coronavirus (hasta un 60%). El grupo de Marra no detectó principios de recombinación genética a través del programa *SimPlot*, pero este mismo grupo, Rota *et al*, 2003; Stavrínides J and Guttman D, 2004 y recientemente; Li W *et al*, 2005 han reportado evidencia sobre recombinaciones en SARS-CoV. La presencia del motivo s_{2m} en 3' terminal de *Spike* soporta la idea de que hay un posible origen aviar del SARS-CoV pues esta secuencia está bien conservada entre coronavirus de aves (Jonassen *et al*, 1998) y se cree que SARS-CoV obtuvo este motivo en algún evento de transferencia horizontal (Marra *et al*, 2003).

Por otra parte, Stavrínides J and Guttman D, 2004, mediante técnicas bioinformáticas de descomposición por fractura, Bayesian y *neighbor-joining* aplicadas en las secuencias de las diferentes proteínas estructurales y la replicasa, demostraron que posiblemente SARS-CoV es una composición de mosaico evolutivo entre un coronavirus de mamífero y uno aviar. Según este análisis, la replicasa tiene un origen vírico de mamífero mientras que M y E provienen de un coronavirus aviar. Lo interesante radica en que la proteína S de coronavirus SARS, que es una proteína que induce anticuerpos neutralizantes [principal determinante antigénico (Buchholz *et al*, 2004)] es una recombinación de ambos: uno aviar y uno felino. *Spike* de virus SARS tiene una alta identidad genética con el coronavirus felino de la peritonitis infecciosa en los primeros 1800 pares de bases, pero que en los siguientes 200 nucleótidos, la secuencia es similar a la del coronavirus aviar. Cabe señalar que en los primeros 600 aminoácidos se encuentra un dominio de unión al receptor (318-510) en donde las mutaciones jugaron un papel importante en el cambio de hospedero, es decir, que este sitio pudo haber mutado al grado de poder unirse al receptor celular humano.

Recientemente se ha reportado experimentalmente (Li W *et al*, 2005) que la etología del coronavirus SARS reside en la diversidad genética virus zoonóticos en murciélagos. Estos coronavirus (SL-CoV Rp3) presentan una identidad del 92%. La diferencia genética se encuentra en el gen S 5' (equivalente a la región S1 de otros coronavirus) y a la región inmediata del gen N. Estas regiones se han identificado como secuencias de mutación alta entre los diferentes coronavirus (Guan *et al*, 2003)

El estudio de S1 de *Spike* permitirá identificar regiones altamente variables, dentro de las cuales, pueden identificarse regiones antigénicas e inmunogénicas para la creación de una posible vacuna. El estudio de esta proteína es entonces, de relevancia para combatir este coronavirus humano emergente que por el momento, puede estar latente en cualquier parte del mundo.

1.3.6 Tratamiento y vacunas

Hasta ahora el tratamiento se ha hecho a base de drogas que disminuyen la fiebre (antipiréticos) aunado a una ventilación mecánica. No existe evidencia de antivirales, esteroides u otras terapias que ayuden a los pacientes, incluso algunos de ellos pueden causar efectos colaterales adversos (Stockman, Bellamy and Garner, 2006). La combinación de medicamentos (Kaletra, Ribavirin y corticoesteroides) ha tenido efectos aparentemente positivos. Muchos blancos proteínicos han sido detectados para la posible elaboración de antivirales tales como, la proteasa principal, la helicasa, la ARN polimerasa y *Spike* (Thiel, 2007)

I.4 La subunidad 1 de *Spike*: principal inductora de anticuerpos en IBV y SARS-CoV

I.4.1 Características generales de la glicoproteína *Spike* en coronavirus

La proteína homotrimérica *Spike* está glicosilada post-traduccionamente; es del tipo I membranal y se caracteriza por formar la “corona” de los coronavirus (Jordi et al, 1989). Posee una ancla membranal conservada y un inusual dominio rico en cisteínas que se encuentra intracitoplásmicamente en el virus (Lewicki and Gallagher, 2002). Esta proteína es la que permite entrar al sistema celular a través de un receptor específico celular, como APN (*aminopeptidase N*) para el grupo I de los coronavirus (Yeager *et al*, 1992); CEACAM1 (*carcinoembryonic antigen-cell molecule*) (Nedellec *et al* 1994), ACE2 (*angiotensin-converting enzyme*) (para SARS-CoV, Li *et al*, 2003) y neuraminidasa 5 para el grupo II y no se ha determinado un receptor celular para el grupo III. Al mismo tiempo, *Spike* permite la fusión virus-célula y célula-célula y define el tropismo celular. En algunos coronavirus (principalmente del grupo II y III) *Spike* se escinde en dos polipéptidos: subunidad 2 (S2) y subunidad 1 (S1) (Binns *et al*, 1985). El amino terminal S1 se cree que tiene una forma globular en la proteína madura; éste contiene el dominio de unión al receptor (RBD, de *receptor-binding domain*) en algunos coronavirus (Fig. 8) que por lo regular abarca los primeros 330 aminoácidos (Kubo *et al*, 1994). Este dominio no ha sido determinado en IBV, pero sí en SARS-CoV abarcando de los residuos 318 al 510 en la parte carboxilo terminal de S1 (Li *et al*, 2005). En IBV, así como en MHV, sí se puede observar una región altamente variable (HVR) entre diversas variantes del virus. S2 (C-terminal), como se puede apreciar en la figura, resulta más conservada que S1 entre diferentes especies de coronavirus. Ésta presenta actividad de fusión membranal; aproximadamente cuenta con 600 aa y a través de modelos se ha reportado que presenta tres estados conformacionales (estado de pre-fusión, estado intermedio pre-asa y estado post-fusión). Durante la fusión membranal, las regiones de siete repeticiones (HR, de *Heptad Regions*) forman una estructura quimérica de asa colocando al péptido de fusión muy cerca de la región C-ter del ectodominio para poder entrar a la célula hospedera (Jordi B *et al*, 1989).



Fig. 8 Comparación de la glicoproteína Spike de diferentes coronavirus. Se muestran las regiones que conforman a S1: péptido señal, dominio de unión al receptor (RBD) y regiones hipervariables (HVR). En S2, más conservado, se muestran regiones de siete repeticiones (HR 1 y 2), y un dominio transmembranal rico en cisteínas (TM). Imagen tomada de Weiss and Navas, 2005.

La proteína *Spike* de IBV presenta 1154 aminoácidos (Weiss and Navas-Martin, 2005), mientras que la de SARS-CoV tiene 1255 (Rota *et al*, 2003). Ambas proteínas inducen anticuerpos neutralizantes en sus respectivos hospederos, además de permitir la unión y fusión membranal (Cavanagh *et al*, 1986, 1984; Tripet *et al*, 2004). La adaptación del virus SARS en humanos y, por lo tanto la especificidad viral hacia su hospedero, involucra solamente el cambio de seis aminoácidos en el *Spike* del virus SARS del mamífero civeta (*Paguma larvata*), lo cual ha sido objeto de estudio no solo como evidencia genética de un origen zoonótico, sino para la búsqueda de epítomos inmunodominantes (Holmes KV, 2003). En IBV, solo bastan 49 aminoácidos mutados (de los cuales, 26 se encuentran en *Spike*) para que el virus se adapte a células de primate, según experimentos de Li *et al*, 2005.

La proteína *Spike* de IBV presenta afinidad hacia el ácido siálico de la superficie de células epiteliales respiratorias, entéricas y urogenitales de aves de corral (Winter *et al*, 2006). Asimismo, la proteína *Spike* del virus SARS utiliza el receptor celular ACE2 (Li *et al*, 2003) de células epiteliales respiratorias de mamífero. El único modelo tridimensional de *Spike* (S1) de coronavirus es el del virus SARS elaborado a través de la similitud con la secuencia de aminoácidos de la neurotoxina B cristalizada de *Clostridium botulinum* (Spiga *et al*, 2003).

1.4.2 La importancia de la subunidad 1 de IBV y SARS-CoV

Para el virus de bronquitis aviar, *Spike* ha sido importante porque es un gran inductor de anticuerpos neutralizantes (Cavanagh *et al*, 1986, 1984). En la parte N-terminal de S2 se ha encontrado una región inmunodominante (aa 541-574 aprox. del serotipo Mass) que fue reconocida por anticuerpos policlonales y por dos anticuerpos monoclonales. Es de importancia mencionar que es una región

antigénica que no está sujeta a variaciones como S1, sin embargo, la neutralización es más baja comparado con epítomos de este último (Lenstra *et al*, 1989). Es por ello que las investigaciones actuales se basan en esta subunidad de 520 aminoácidos para la búsqueda de epítomos inmunodominantes que puedan inducir una respuesta inmunológica.

La subunidad 1 (N-terminal) de IBV es un polipéptido que se ensambla mediante interacciones no covalentes con S2. Esta subunidad, además de proporcionar una estructura globular a la proteína *Spike*, es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes y con actividad de hemaglutinación (Cavanagh D, 1983). Por otra parte, se ha reportado que S1 presenta más sustituciones de aminoácidos que S2 (Niester *et al*, 1986). La tasa de variabilidad genética de S1 que varía entre el 4 y 6% (Niester *et al*, 1986), principalmente entre la primera y tercera parte de la subunidad (regiones hipervariables, HVR), ha provocado la emergencia de nuevas cepas y serotipos (Cavanagh *et al*, 1984; Mockett *et al*, 1984). Es en estas partes donde existen epítomos inmunodominantes detectados por anticuerpos neutralizantes (Kant *et al*, 1992; Cavanagh, 2003). Tales regiones altamente variables se localizan aproximadamente entre los aminoácidos 38-51 (HVR-1), 99-115 (HVR-2), identificadas por Niester *et al*, 1986 y entre los aminoácidos 274-387 por Koch *et al*, 1990 en el serotipo Mass. En estas zonas se han identificado tres regiones antigénicas (no a nivel de aminoácidos) determinadas por anticuerpos monoclonales o policlonales de sueros de aves (Fig. 9). Los antígenos I (residuos 24-61) y II (residuos 132-149) se encuentran en la primera parte de S1 y el antígeno III (291-398) se localiza fuera de HVR (Koch *et al*, 1990; Kant *et al*, 1992; y Moore *et al*, 1997).

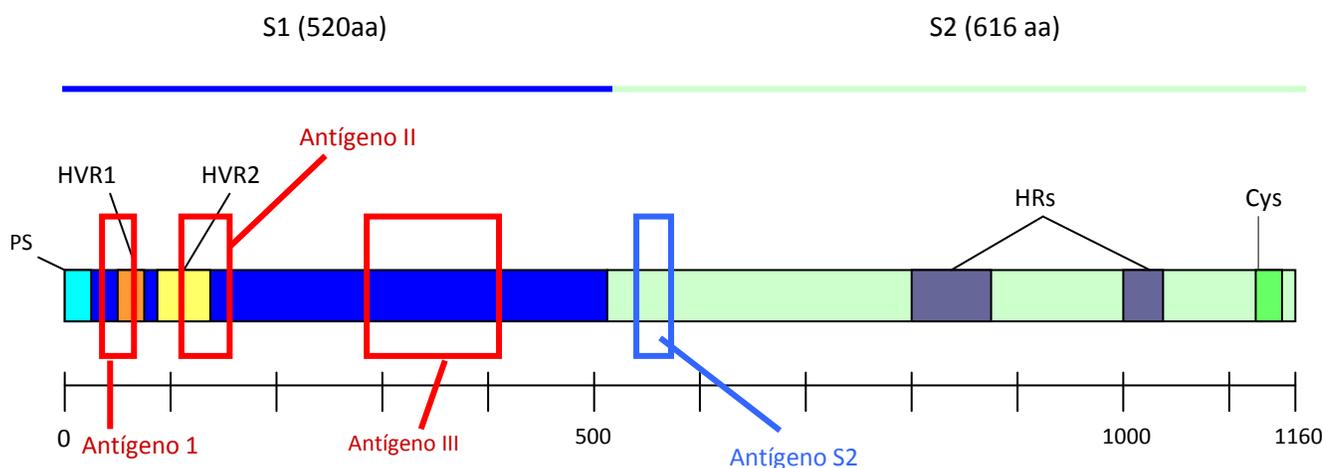


Fig. 9 Sitios antigénicos de la proteína *Spike* de IBV detectados por anticuerpos monoclonales y policlonales. Se observan las regiones hipervariables (HVR) 1 y 2 que incluyen al Antígeno I (aminoácidos 24-61) y al Antígeno II (aminoácidos 132-149), respectivamente. En la tercera parte de S1 se localiza el Antígeno III (aminoácidos 291-398). En S2 se ha encontrado una región antigénica que abarca los aminoácidos 541-574 y es más conservada. HRs, motivos estructurales repetidos de siete aminoácidos; (Cys) región rica en cisteínas.

La subunidad 1 (removida por urea, expresada en baculovirus, poxvirus o adenovirus) ha sido utilizada en pruebas de inmunoensayo y de protección de aves (Cavanagh *et al*, 1986; Song *et al*, 1998; Wang *et al*, 2002; Johnson *et al*, 2003). Si bien, la respuesta inmune protectora es relativamente variada (desde un 0% hasta un 90% de protección, según la secuencia de aminoácidos de la cepa utilizada, la raza de las aves inoculadas, el número de inmunizaciones y los órganos protegidos) ha sido menos problemático que la utilización de vacunas vivas que ofrecen poca protección cruzada y provocan la re-emergencia de nuevas variantes (Cavanagh, 2003).

La subunidad 1 y 2 de la proteína *Spike* de SARS-CoV han sido determinadas a través de alineamientos de secuencias de las subunidades de otros coronavirus puesto que no se ha visto que se escindan proteolíticamente (Fig. 10). La subunidad 1 presenta 666 aminoácidos, mientras que S2 tiene 583 residuos aproximadamente (Spiga *et al*, 2003; Gallagher and Buchmeier, 2001).

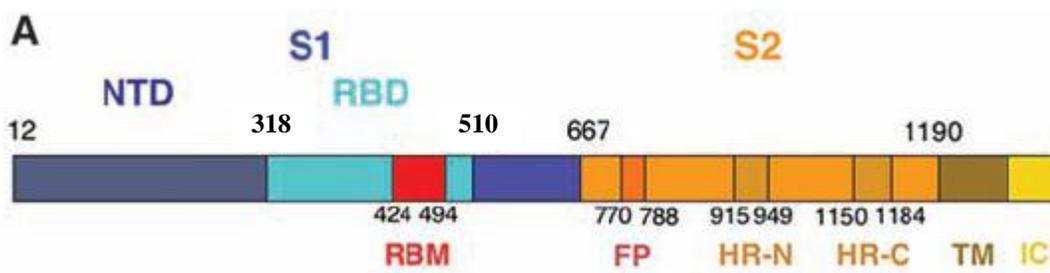


Fig. 10 Dominios y motivos importantes de la proteína *Spike* del virus SARS. La subunidad 1 contiene un dominio amino terminal y un sitio de unión al receptor (RBD), el cual a la vez, presenta un motivo de unión al receptor (RBM). La subunidad 2 contiene un péptido de fusión (FP), dos motivos conformacionales amino y carboxilo terminal de siete residuos repetidos cada uno (HR-N y HR-C), un sitio transmembranal (TM) y una región intracelular (IC) Imagen tomada de Li *et al*, 2005.

En la región S1, entre el residuo 318 y 510, se ha identificado el dominio de unión al receptor (RBD), el cual tiene afinidad por el receptor celular ACE2 (Fig. 11). Este dominio presenta aminoácidos críticos para la determinación del tropismo celular y para la selección del hospedero (Li *et al*, 2005).

Estructuralmente RBD se compone de dos subdominios: un core, compuesto por cinco hojas plegadas β ($\beta 1$ - $\beta 4$ y $\beta 7$) y con tres α -hélices cortas interconectadas (αA - αC) y un bucle extendido representado por dos hojas β (5 y 6). En el primero se encuentran conexiones de puentes disulfuro que conectan las cisteínas 323 a 348, 366 a 419 y 467 a 474. La concavidad del bucle permite la unión de sus hélices con el receptor celular. Li y cols (2005) encontraron que los residuos 424-494 realizan todos los contactos con ACE-2, por lo que denominaron a esta región motivo de unión al receptor (RBM) (Fig. 11)

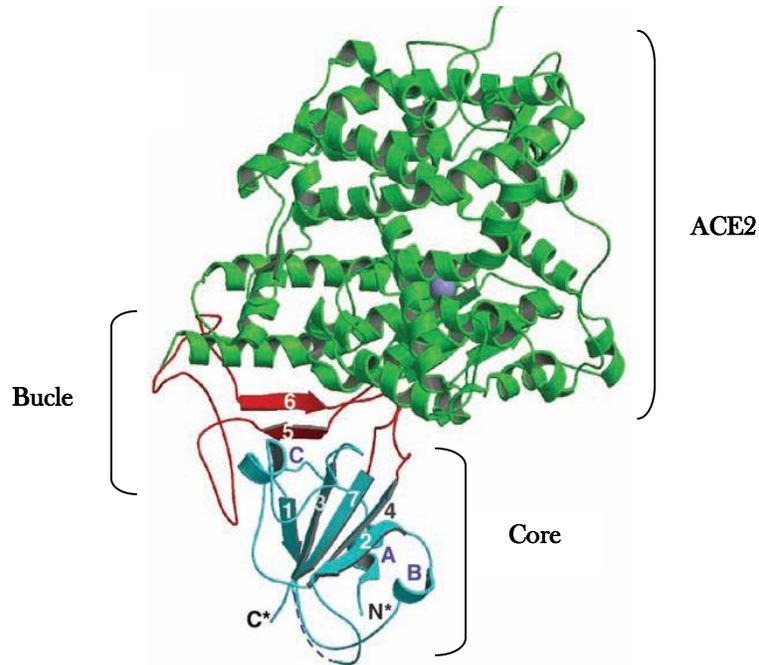


Fig. 11 Cristal de RBD en unión con ACE2. El core de RBD tiene cinco hojas plegadas β en flechas (1-4 y 7) y tres α -hélices (A-C). El bucle de RBD contiene al RBM representado por dos hojas β (5 y 6) en complejo con una de las concavidades del receptor humano ACE-2). Imagen tomada de Li, et al, 2005.

La función del RBD no tan solo se limita a la unión con ACE2, sino que se ha visto que es un sitio muy inmunogénico puesto que ha sido el principal blanco de anticuerpos neutralizantes (Fig 12). Este dominio de 193 residuos presenta epítomos dependientes de conformación (He *et al*, 2005) y del cual se ha sugerido que puede servir como un candidato para el desarrollo de vacunas seguras y efectivas. Al mismo tiempo, se ha cristalizado la interacción de este dominio con un anticuerpo monoclonal (m396), el cual compite con ACE2 por unirse a los residuos críticos (*hotspots*) Ile489 y Tyr491 (Prabakaran *et al*, 2006).

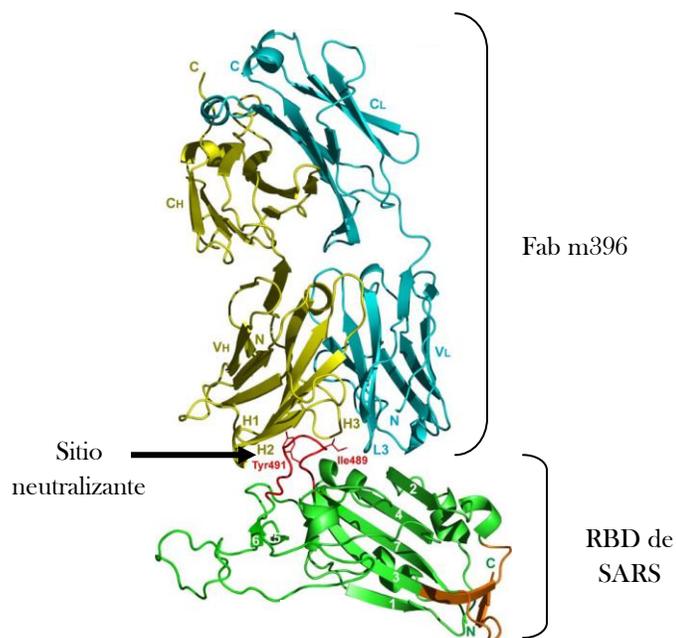


Fig. 12 Estructura tridimensional del complejo RBD-Fab m396. El sitio neutralizante de SARS-CoV comprende los residuos Ile489 y Tyr491, los cuales se unen covalentemente al anticuerpo monoclonal Imagen tomada de Prabakaran *et al*, 2006.

I.5 *Phage display*: determinación de epítomos inmunodominantes

Phage display es una metodología combinatoria que permite la presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas al azar en la superficie de fagos filamentosos (virus de ADN de una sola cadena de 6400 nucleótidos que infectan bacterias Gram negativas), las cuales se utilizan para estudios básicos de reconocimiento molecular, interacción entre epítomo-anticuerpo y como fuente de colecciones de antígenos para métodos de diagnóstico y búsqueda de inmunógenos. La técnica fue desarrollada en 1985 por George Smith, quien demostró que la introducción de secuencias de péptido exógenas al genoma de fagos generaría bibliotecas de péptido desplegadas en las proteínas de la cápside (pIII) con una diversidad de hasta 10^{10} variantes simultáneamente (Smith, 1985).

En general, para la selección de afinidad del ligando de las bibliotecas combinatorias (*biopanning*) se requieren de cuatro pasos fundamentales (Fig. 17) (Smith and Scott, 1993):

1. Preparación de la biblioteca primaria o la amplificación de una ya existente y la exposición de los fagos a la molécula blanco inmóvil (proteína aislada, proteína celular o endotelio vascular).
2. Remoción de fagos inespecíficos al blanco.
3. Obtención del fago con afinidad al blanco mediante elución y amplificación del fago eluido en *Escherichia coli*.
4. Repetición del proceso hasta dos o cuatro rondas con el eluido de fagos específicos.

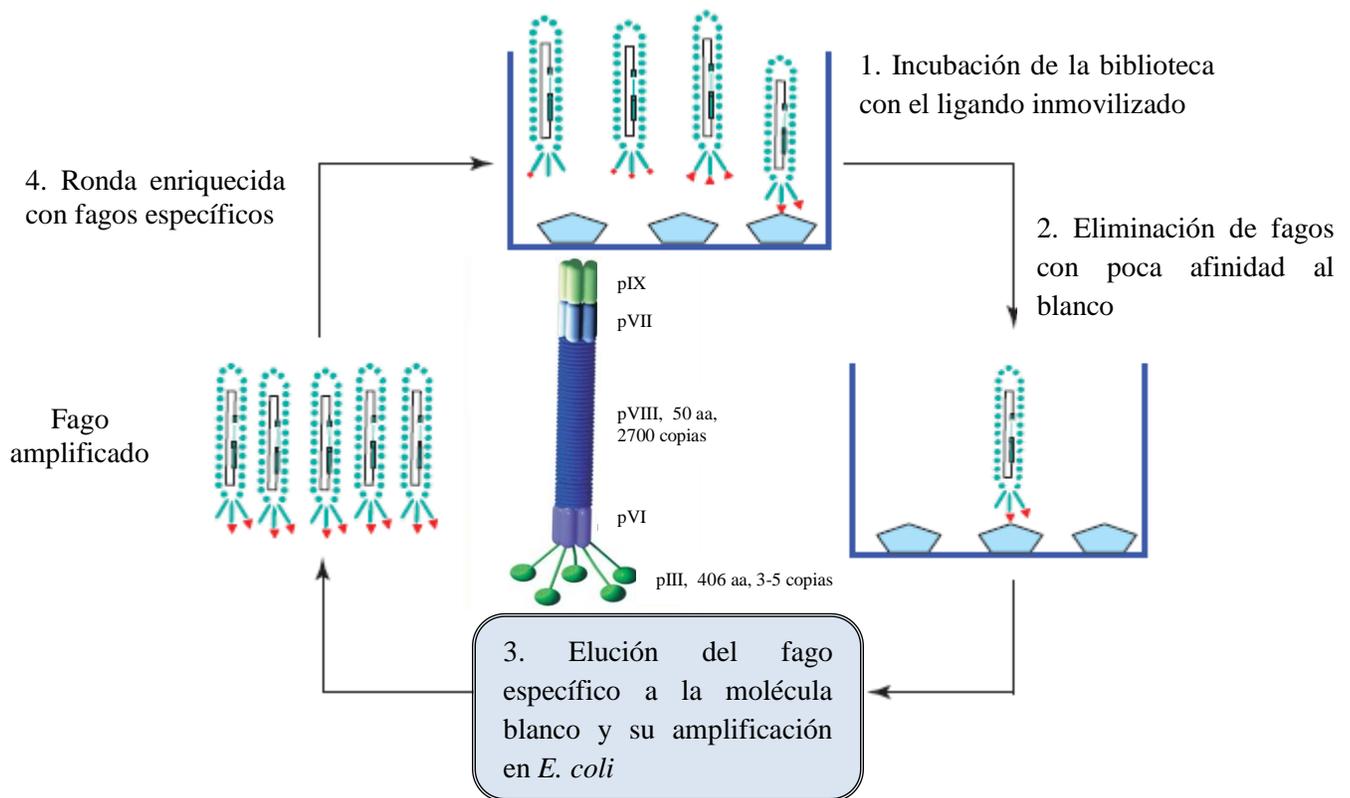


Fig. 13 Representación de un ciclo de la bioselección o tamizado (biopanning) para identificar aquellos fagos con la proteína de fusión (en la pIII) que se une al ligando. En la parte central se muestran las proteínas estructurales de un fago filamentoso (pIII, pVI, pVII, pVIII and pXIX). Los péptidos exógenos son expresados usualmente en la pIII de 3 a 5 copias hasta de 12 aminoácidos, aunque las bibliotecas con la pVIII pueden llegar a desplegar 2700 copias, cada una con seis residuos (Greenwood *et al*, 1991). Imágenes tomadas de Arap, 2005 y Mullen *et al*, 2006.

La técnica de desplegamiento de péptidos en fagos ha tenido diferentes aplicaciones en campos como la inmunología, la biología celular, la farmacología y el descubrimiento de nuevos medicamentos (Smith and Petrenko, 1997; Adda *et al*, 2002; Gazarian, 2005). Una de las aplicaciones más importantes es el mapeo de epítomos inmunodominantes (Scott and Smith, 1990). La construcción de bibliotecas de epítomos puede llegar a contener toda la variedad de determinantes potenciales del repertorio antigénico que puede reconocer el sistema inmunológico humano (que es 10^6 - 10^7 , mientras que las bibliotecas expresan hasta 10^9 variantes de epítomos potenciales). Estos péptidos seleccionados en el tamizado en realidad están emulando las propiedades estructurales del epítomo nativo en interacción con su parátomo e induciendo una respuesta inmunológica, razón por la cual, se les ha denominado mimótopos (Geysen *et al*, 1986). Asimismo pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos semisintéticos (Fab o Fv) de las bibliotecas del repertorio de inmunoglobulinas (Barbas *et al*, 1992; de Kruif *et al*, 1995) para después probar sus afinidades y multiplicar aquellas variantes que resulten específicas al blanco.

Ya sea en forma de péptidos o anticuerpos, las bibliotecas combinatorias tienen aplicación tanto para diagnosis como para inmunización debido a que ofrece ventajas sustanciales sobre de los péptidos sintetizados químicamente y anticuerpos producidos en hibridomas por la rapidez de su síntesis en fago (100 fagos en 40 minutos), no requiere de acarreadores, por su inmunogenicidad sin adyuvantes (ya que el fago juega este papel, Galfre *et al*, 1996) y, más importante, por variabilidad estructural de los mimótopos que se obtendrá para cada epítipo.

En los últimos años, *phage display* se ha convertido en una herramienta eficiente para identificar y mapear epítipos de antígenos claves de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoides (Dybwad *et al*, 1995); enfermedades parasitarias como la taeniosis (Gazarian *et al*, 2001); enfermedades bacterianas como la neumonía (Buchwald *et al*, 2005), la melioidosis (Chan and Nathan, 2005), la bronquitis y sinusitis (Bishop-Hurley *et al*, 2005) y, por último, enfermedades víricas como el sida (Weiner *et al*, 1995; Yang *et al*, 1995), la hepatitis B (Folgori *et al*, 1994) y el dengue (Yao *et al*, 1995). En especial esta última aplicación de la técnica ya que hasta el momento no se ha podido desarrollar una tecnología eficiente para el desarrollo de vacunas contra la mayoría de las enfermedades ocasionadas por virus de ARN debido a que no presenta una ADN polimerasa que permita reparar el ADN intermediario dañado (*proof-reading*) permitiendo que haya una alta tasa de mutación. El hecho de utilizar *phage display* en estos blancos virales, podría permitir predecir las posibles secuencias de aminoácidos de las proteínas antigénicas (como son las proteínas de envoltura de IBV y SARS-CoV) que darán lugar a variantes virales futuras y la selección artificial de aquellos mimótopos que pueden inducir una respuesta inmunológica en el hospedero. El proceso evolutivo artificial *in vitro* toma lugar en masa con millones y miles de millones de moléculas simultáneamente (entre ellas las variantes posibles de los epítipos virales). Solo al final, después de varias rondas de selección, quedarán las subpoblaciones de clonas de fago específicas al anticuerpo generado (Smith, 2001).

JUSTIFICACIÓN

La industria aviar se ha visto afectada por las constantes pérdidas económicas debido a la baja o nula producción y calidad de huevos y por la muerte de aves jóvenes ocasionados por la infección del coronavirus de bronquitis infecciosa. Las vacunas a base de virus vivo atenuado usadas en la actualidad no inducen una protección cruzada entre variantes endémicas. Además, se ha reportado que las cepas vacunales, como Mass y Conn, pueden provocar la emergencia de nuevos virus debido a mutaciones secundarias que ocasionan una reversión a virulencia. El estudio de epítomos inmunodominantes de proteínas superficiales como *Spike* de IBV permitirán el desarrollo de nuevas estrategias para la inducción de una respuesta inmune eficiente en los hospederos aviares. Es por ello que se ha elegido la metodología de *phage display* (la cual no ha sido aplicada en este modelo viral) y análisis comparativos de hidrofiliidad, antigenicidad y de estructura secundaria de la ya caracterizada proteína *Spike* de SARS-CoV para la identificación y caracterización de epítomos a nivel estructural e inmunológico de su proteína homóloga en IBV.

HIPÓTESIS

Mediante la selección de mimótopos inmunogénicos de bibliotecas combinatorias de fagos y análisis comparativos de hidrofiliidad y estructura secundaria de proteínas, permitirán la identificación y caracterización de los epítomos inmunodominantes de la proteína *Spike* del virus de bronquitis infecciosa.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar epítomos inmunodominantes de la proteína *Spike* de IBV a través de la selección de péptidos miméticos inmunogénicos de fagos y comparar las regiones antigénicas respectivas de la secuencia de aminoácidos de *Spike* del virus del síndrome respiratorio agudo severo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Inocular virus y péptidos sintéticos acoplados a animales hospederos y no hospederos para inducir anticuerpos.
2. Utilizar los anticuerpos generados para la selección de péptidos miméticos de una biblioteca combinatoria de 12 residuos.
3. Determinar la secuencia de aminoácidos de los mimótopos seleccionados.
4. Utilizar los mimótopos como inmunógenos en ratones y aves y evaluar la reactividad de los anticuerpos generados (anti-mimótopos) con respecto a los virus y péptidos.
5. Identificar el sitio inmunodominante de *Spike* de IBV mimetizado por los mimótopos a través de análisis comparativos entre secuencias de aminoácidos de variantes de IBV.
6. Comparar las secuencias de aminoácidos de los epítomos inmunodominantes caracterizados en IBV por *phage display* con los sitios respectivos inmunodominantes de *Spike* de SARS-CoV mediante perfiles hidrofílicos y antigénicos, así como análisis de estructura secundaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

VI. 1 Animales de experimentación

Se trabajó con conejos hembras (Nueva Zelanda) de 2.5 kg y ocho semanas de nacidos (BIOTINOX S.A. de C.V., México) para la obtención de anticuerpos antivirales. Se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6J obtenidos por derivación cesárea, de tres a cuatro semanas de edad (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) para la inoculación de mimótopos de fagos seleccionados por IgG anti-péptido. Se usaron pollos libres de patógenos de la cepa *White Leghorn* de cuatro semanas de edad (ALPES Co., Tehuacán, Puebla, México) para la obtención de anticuerpos antivirales y para ensayos de protección con mimótopos seleccionados por inmunoglobulinas antivirales de conejos y aves. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio con ciclos de luz-obscuridad de 12 hrs, con alimento y agua a libertad.

VI.2 Antígenos utilizados para inoculación y pruebas de ELISA

VI.2.1 Virus

Las cepas víricas de bronquitis infecciosa fueron aisladas, identificadas y caracterizadas por el equipo de trabajo del Dr. Rogelio Alonso en el Departamento de Aves y en el Laboratorio de Genética Molecular y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnica (FMVZ), UNAM (véase Tabla A2 en ANEXO II). Las cepas utilizadas pertenecieron al serotipo Massachusetts (Mass, núm. de acceso en *Genbank*: EU526409), Conn y Ark y los serotipos locales fueron UNAM 2001 (núm. de acceso en *Genbank*: EU526405), UNAM 97 y BL 56, todos amplificados en la cavidad alantoidea de embriones libres de patógenos específicos de 9 a 11 días de edad incubados a 37°C. En el embrión se presentaron las lesiones características de la bronquitis infecciosa después de cuatro o cinco pases. El líquido alantoideo fue obtenido de forma aséptica, centrifugado a 35, 000 rpm durante una hora. El botón fue suspendido en búfer salino de fosfato (PBS) y conservado a 85 °C bajo cero hasta su utilización. Las cepas de IBV fueron utilizadas para inducir una respuesta de anticuerpos en aves y en conejos, así como en pruebas de ELISA como antígenos.

VI.2.2 Péptidos sintéticos

Los péptidos de S1 de *Spike* de IBV, $N_{-ter103}$ -NFTNLVVFVTHCFV- $_{-113C-ter}$ (P103) y N_{-ter} $_{-138}$ -MKSNGTGPSDLLYNLTV- $_{-151C-ter}$ (P138) (Véase ANEXO I), fueron elegidos por sus residuos conservados que flanquean a HVR-2 de variantes de IBV de California (por tener homología con la cepa mexicana UNAM 2001). Los péptidos fueron sintetizados por la empresa *Gene Script*® (USA). Se hicieron alícuotas de 5 µl cada uno disueltos en agua mili-Q (Véase Tabla A1 en ANEXO I). Los péptidos fueron acoplados a un acarreador (albúmina bovina sérica) mediante el método de un solo paso de acuerdo al Manual del Laboratorio de Harlow E y Lane D, 1988. Se utilizó el agente homobifuncional glutaraldehído (0.2% en PBS) mezclándolo 1:1 con el péptido-acarreador en agitación. La solución se incubó a temperatura ambiente por una hora. A la solución se le agregó glicina 1 M a un pH de 7.2 y en un 25% del volumen. Se agregó glicerol (5% del volumen) a la mezcla en agitación durante una hora. El conjugado se separa en una cromatografía por columna con gel Sephadex G-10. Se demostró, mediante electroforesis, la existencia del acoplado (véase Fig. A4 en ANEXO I). Se obtuvieron tres eluatos (3 ml c/u) cuantificándose, por el método de Bradford (*BioRad protein assay*), hasta 7.68 µg/µl del acoplado.

VI.3 Suero de aves y conejos inoculados con IBV

VI.3.1 Inoculación de cepas víricas y péptidos sintéticos a aves y conejos y obtención de suero inmune

La inoculación de las cepas Mass y UNAM 2001 en aves se realizó en el Departamento de Aves, FMVZ, UNAM a cargo del equipo de trabajo del Dr. Rogelio Alonso (véase Tabla A3 en ANEXO II). Las aves fueron inoculadas intranasalmente con 10^4 $DIE_{50\%}$ (dosis media infectiva) de IBV y de acuerdo al Código Federal de Regulaciones (*Code of Federal Regulations*, 2007). En el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBB), los conejos fueron inoculados subcutáneamente en la primera inmunización con la suspensión viral (de 300 a 1000 µg/ml/animal) o con el conjugado péptido-BSA (1 mg/ml) suplementado con el adyuvante completo de Freund (1 ml) seguido de dos inmunizaciones con intervalos de tres semanas utilizándose péptido sintético libre y adyuvante incompleto de Freund.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de acuerdo al tipo de animal (vena de oreja de conejos y del radio y/o dorso superior de aves) y de acuerdo a las normas establecidas por el Departamento de Aves de FMVZ y por el Bioterio del IBB, UNAM (Capítulo II del Código Ético). El suero de cada animal se obtuvo mediante la centrifugación de la muestra sanguínea a 3,000 rpm durante 25 min. y a temperatura ambiente para después ser alícuotado y congelado a 25°C bajo cero.

VI.3.2 Evaluación de la reactividad de los sueros policlonales contra virus y péptidos

Para todos los ensayos de inmunoabsorbancia ligado a enzima (ELISA) se utilizó 1 µg del antígeno (virus, péptido libre o acoplado), el cual se diluyó en 100 ml de búfer de Na₂CO₃ (0.2 M, pH 9.5) para sensibilizar los pozos de una microplaca de poliestireno de 96 pozos (*MaxiSorp™ Nunc Roskilde, Denmark*). Los antígenos suspendidos en la placa se incubaron toda la noche a 4°C. El exceso de la solución con antígeno se retiró. Cada pozo sensibilizado se llenó con un búfer de bloqueo (PBS/BSA 1%) por una hora a 37°C. El búfer de bloqueo se descartó y se realizaron seis lavados con PBS 1x-Tween 20 0.3%. Alternadamente, se prepararon las diluciones de los sueros de ave o conejo en PBS 1x-BSA 0.02%-*Tween* 20 y se transfirieron a los pozos con el antígeno. La microplaca se incubó durante una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados como en el paso anterior. Se diluyó 1:1,000 un anticuerpo comercial anti-IgY o anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina (*Zymed Laboratories®*, USA) en PBS 1x-BSA 0.02%-*Tween* 20. Se agregaron 200 µl del conjugado diluido a cada pozo con el antígeno y la microplaca se incubó a 37°C durante una hora. Se repiten los lavados. Se diluyó el sustrato p-nitrofenil fosfato (*Sigma®*) en el amortiguador de dietanolamina 1 M, pH 9.8 para el revelado y de éste se agregaron 200 µl a cada pozo. La placa se incubó a 37°C entre 30 min. y una hora. Las densidades ópticas se determinaron por un lector de absorbancia (*Humerader®*, Humarco) a 405 nm. La positividad de los sueros inmunes fue considerada cuando el valor de absorbancia (Abs) sobrepasó el valor de corte o *cutoff* (se calculó usando la media de los valores de Abs de los sueros preinmunes más tres desviaciones estándares).

VI.3.3 Purificación de inmunoglobulinas

Las fracciones de inmunoglobulina Y (IgY) de aves fueron purificadas mediante cromatografía por afinidad de acuerdo a las instrucciones establecidas en el protocolo *Hi Trap IgY purification HP 5ml®* de *Amersham Biosciences* en el cromatógrafo automatizado *AKTA Design System*. Las columnas de afinidad (5 ml) contenían 2-mercapto-piridina acoplada a sefarosa. El suero aviar fue diluido primeramente en el búfer de unión (20 mM Na₂HP0₄ - 0.5 M K₂SO₄ pH 7.5). Los lavados se realizaron con 20 mM de Na₂HP0₄ - 30% 2-propanol y la elución del anticuerpo fue llevada a cabo con 20 mM Na₂HP0₄ pH 7.5. Se obtuvieron fracciones de 1.5 ml, cuantificadas por el método de Bradford y analizadas a través de un ensayo de reactividad por ELISA (Véase Tabla A4 y Fig. A5 en ANEXO III).

Para obtener la fracción de IgG de conejos se utilizó la técnica de purificación por cromatografía de afinidad de un solo paso mediante el uso de la proteína G agarosa de *Streptococcus (Invitrogen Life Technologies®)*. La proteína G fue mezclada en un volumen 1:2 con respecto al suero. La mezcla fue incubada durante 20 min. a temperatura ambiente y centrifugada durante 30 segundos a 3,000 rpm. Se

desechó el sobrenadante y el proceso se repitió tres veces. Al botón se le añadió un volumen 1:4 del amortiguador de unión (NaPO_3 0.01 M/ NaCl 0.15M, pH 7) y se centrifugó de la misma forma. Se desechó el sobrenadante y el procedimiento se repitió tres veces (antes de cada centrifugación, la solución se homogeneizaba suavemente). El botón se mezcló con búfer de elución (glicina-HCl, pH 2.6) en un volumen 1:3 y se mantuvo en hielo durante 3 min. y después se centrifugó a 4,000 rpm. El sobrenadante se neutralizó con tris-HCl 1 M, pH 9.1. El método de Bradford fue utilizado para cuantificar hasta 8-10 mg/ml de IgG con un rendimiento del 80-85% en ELISA. Para evaluar la reactividad de cada anticuerpo en ELISA se sensibilizaron cada microplaca con 5 μg del concentrado de proteína IgG o IgY

VI. 4 Selección de clonas de fago por anticuerpos de aves y conejos

VI.4.1 *Biopanning*

Se utilizó la biblioteca de 12 residuos (*Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit*) de *New England BioLabs®*, Beverly, MA, USA. Las secuencias de péptidos al azar desplegadas en el fago (2.7×10^9 transfectantes) están fusionadas, a través de un espaciador Gly-Gly-Gly-Ser, a la proteína pIII del fago M13. La biblioteca fue amplificada hasta contener aprox. unas 20 copias de cada secuencia por 10 μl (la cantidad usada en un *biopanning* simple).

El *biopanning* se basó en el procedimiento descrito por Smith y Scott, 1993; y Dower y Cwirla, 1994, con ajustes menores (Gazarian *et al*, 2001). En breve, dos pozos de una placa de poliestireno de 96 pozos (*Immulon 4 flat bottom plates*, Dynatech Lab Inc., USA) fueron sensibilizados con 15 y 7.5 μg de IgG o IgY en 100 μl de PBS. La solución fue incubada toda la noche a 4 °C con agitación suave. La IgG o IgY no unida se removió mediante seis lavados con PBS-T (PBS 1x y 0.1% de *Tween* 20). Los pozos fueron bloqueados con 300 μl PBS 1x y 1% de BSA durante una hora a 4 °C, seguidas de cinco lavados consecutivos usando PBS 1x a temperatura ambiente. Para la selección por afinidad, se agregaron 10 μl de la biblioteca (2×10^{10} unidades formadoras de placa, ufp) a 190 μl de PBS-T en los dos pozos (100 μl c/u) con la inmunoglobulina inmovilizada. Esta mezcla fue incubada durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave para promover la afinidad del fago con el anticuerpo. El fago no unido se desecha y se lava 10 veces con PBS-T. La elución del fago se realizó con 100 μl de la solución glicina-HCl 0.2 M (pH 2.2) y 1 mg/ml de BSA incubándose cerca de 10 min a temperatura ambiente. El eluido fue trasladado a un tubo nuevo y neutralizado con 15-20 μl de Tris-HCl 1 M (pH 9.1). Para titular la cantidad de fagos del eluido obtenido antes de su amplificación, es necesario utilizar la cepa ER2738 de *E. coli* (*New England BioLabs®*) en fase *log* crecida en medio LB/x-gal/IPTG (por conteo de placa y el factor de dilución se obtiene la multiplicidad de infección del fago, MOI) de acuerdo al Manual Ph.D.-12 de *New England*

BioLabs[®]. Para el amplificado viral (de acuerdo al Manual Ph.D.-12TM), se agregó aproximadamente un 75-80% del eluido del *biopanning* en 20 ml del cultivo ER2738 (en fase *log* temprana) y se incubó a 37°C con agitación vigorosa por 4 hrs. El cultivo se transfirió a un tubo para centrifuga y se centrifugó durante 10 min. a 10,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo esterilizado y se vuelve a centrifugar. Todo el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, el cual contenía ¼ de volumen de polietilenglicol (PEG)/NaCl (20%/10%); se agitó suavemente y se dejó precipitar a 4°C durante toda la noche.

El amplificado se centrifugó durante 10 min a 10, 000 rpm y se desechó todo el sobrenadante. El botón se resuspendió (en todo el procedimiento de purificación se utilizan pipetas con filtro) en 1 ml de PBS 1x y se hizo una segunda centrifugación. Se transfirió a un tubo de centrifuga nuevo que contenía ¼ del volumen de PEG-NaCl dejándose precipitar en hielo durante una hora a 4°C. Se centrifugó (10 min. a 10, 000 rpm) y el sobrenadante se desechó. El botón se le agregó PBS-NaN₃ (azida) al 0.02%. Se centrifugó en las mismas condiciones durante 5 min. y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para ser almacenado a 4°C. Este eluido (10¹²-10¹³ ufp) es la amplificación de la primera ronda y está listo para ser usado en el *biopanning* de segunda y tercera ronda (se incrementa la astringencia: PBS-0.5% de *Tween* 20) donde se procede de la misma forma.

VI.4.2 Amplificación y caracterización de las clonas individuales

El eluido de la tercera ronda fue titulado sin amplificar en cajas Petri con LB/x-gal/IPTG. Cada placa azul (célula bacteriana infectada con el fago recombinante) fue extraída (con una punta estéril para pipeta) del medio de cultivo para ser amplificada y secuenciada (entre 10-20 clonas de tercera ronda son suficientes para identificar una secuencia consenso de unión al anticuerpo). Para la amplificación, cada placa se colocó en tubos con 3 ml de medio 2XYT (según Manual de Ph.D.-12). Las placas individuales se incubaron a 37°C con movimiento durante 4.5 hrs. Las placas se transfirieron a dos tubos para microcentrífuga (uno fue para almacenamiento y el otro, para secuenciación de ADN) y se centrifugaron durante 30 segundos. Para almacenar cada una de las clonas, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se vuelve a centrifugar. Con la pipeta se extrajo todo el sobrenadante a otro tubo. El amplificado se almacenó a 4°C.

Por otro lado, para realizar la secuenciación, se apartó un tubo con el amplificado antes del proceso de almacenamiento. A este tubo se le agregó 200 µl de PEG/NaCl, se resuspendió y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min. La solución se centrifugó por 10 min. y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió con 100 µl de búfer de yodo y se le agregó 250 µl de etanol. La solución se incubó por una hora en hielo y a 4°C. Se centrifuga por 10 min. y se descarta el sobrenadante. Se lava el botón con 70% de etanol y se seca en la vacufuga. El botón se resuspende en 15-20 µl de agua inyectada.

Para la secuenciación manual del ADN de las clonas se utilizó el método de Sanger y se realizó mediante el kit de Sequenasa™ (AMERSHAM®, USA) usando dideoxinucleótidos marcados radiactivamente con ³⁵S.

Para evaluar la afinidad de las clonas seleccionadas con los anticuerpos de aves o conejos se procedió a hacer una ELISA similar a la anteriormente descrita. Las diferencias estribaron solo en la sensibilización de la placa con clonas de fago (1×10^9 - 1×10^{10} ufp) diluidas en 100 µl de PBS 1x- 50 ng de BSA y el uso de PBS-0.1% de Tween 20 para lavados,

VI.5 Utilización de mimótopos como inmunógenos

VI.5.1 Mimótopos de la secuencia HVR de S1

Para demostrar la inmunogenicidad de los mimótopos seleccionados con anticuerpo anti-péptido sintético de HVR de *Spike* fueron inoculados a ratones vía intraperitoneal. El esquema de inmunización consistió en tres inoculaciones de 2.5×10^{11} ufp (el mismo fago actúa como adyuvante) en 100 µl de PBS 1x por 20 g del peso corporal con intervalos de una semana. Las sangrías se realizaron a través de una pequeña incisión en el tercio medio de la parte ventral de la cola. La obtención del suero, la purificación de IgG y las pruebas de ELISA (los antígenos usados fueron péptido sintético, virus UNAM 2001 y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón) se realizaron de igual forma que en conejos.

VI.5.2 Mimótopos de la secuencia Spike de IBV: ensayo de protección

El ensayo de protección se realizó en las instalaciones del Departamento de Aves, FMVZ, UNAM considerando las normas internas sobre el manejo de aves. Se utilizaron aves jóvenes (cuatro semanas de edad) libres de patógenos, las cuales fueron inoculadas, cada 15 días durante un mes. Grupos de aves fueron inoculados intraperitonealmente con las clonas (10^{12-13} ufp en un volumen de 600 µl de PBS 1x) seleccionadas por las inmunoglobulinas de aves y conejos inoculados con el virus Mass y UNAM 2001, respectivamente, para evaluar la respuesta inmunogénica de los péptidos miméticos. Para comparación de la respuesta inmune inducida por los mimótopos, grupos de aves se les suministró la vacuna comercial bronni-mex™ (emulsión bivalente de cepas Mass y Conn), por vía epitelial en parte dorsal superior del cuello del ave, con un volumen de 100 µl, de acuerdo a las especificaciones de AVIMEX®.

La muestra sanguínea de cada uno de los grupos se obtuvo a través de la vena radial o de la parte dorsal del cuello del ave. Las muestras fueron procesadas de la misma forma descrita anteriormente. Los

sueros de un mismo grupo de ave fueron combinados (*pool*) considerando que todos recibieron la misma dosis del agente vacunal el mismo día.

El desafío de las aves inmunizadas se realizó con la cepa UNAM 2001 en un volumen de 100 μ l con una dosis infectiva de 1×10^4 EID₅₀ por instilación ocular y a los 40 días después de la primera inmunización. Las aves fueron sacrificadas al quinto día. Las muestras tisulares fueron extraídas de tráquea, pulmón y riñón y colocadas en un tubo con búfer de formalina al 10% y pH 7.4. Los estudios histopatológicos fueron realizados por el personal del Departamento de Aves.

VI.5 Métodos computacionales

Las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas *Spike* de las cepas virales fueron obtenidas del Banco de Datos de Proteínas [*Protein Data Bank* (PDB), por sus siglas en inglés] utilizados para realizar análisis comparativos con las secuencias de los mimótopos seleccionados y con la secuencia de S1 de *Spike* del virus SARS. A continuación se muestran los virus utilizados en estos análisis; en paréntesis se muestra su número de acceso en PDB: Mass 41 (AAS67646), Conn (AAS67650), Ark (AAD27667), Beaudette (CAC39300), CA 88 (AAM09501), D207 (AAA46227) PA/5083/99 (AAV83669), VicS (AAB00381) BL 56 (AAK19756), UNAM 97 (AAK53756), UNAM 2001 (ACB12052), SARS-CoV Tor (AAP41037) y SARS-CoV Urbani (AAP82968). La numeración de cada uno de los aminoácidos de *Spike* de los virus se basó en aquellas secuencias completas de S1 en el PDB.

El alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se realizó con el programa ALIGN versión 2 (Myers y Miller, 1989). Para realizar un alineamiento múltiple se utilizó el programa bioinformático CLUSTALW versión 3.2 (Thompson, Higgins, Gibson, 1994). El árbol filogenético sin raíz se realizó mediante el programa *Phylogeny Inference package* versión 3.2 (PHYMLIP de Felsenstein J, 1989). El programa PsiPred V2.6 de David Jones (1999) se utilizó para realizar la posible estructura secundaria de S1 de IBV (véase ANEXO III). Este programa se basa en la posición específica de las matrices de puntuación generados por PSI-BLAST. El modelo tridimensional de la subunidad 1 de la proteína *Spike* de SARS-CoV fue obtenido del servidor ExpASy con número de acceso P59594 y manipulado por el programa Swiss-PdbViewer (Guex and Peitsch, 1997). Para realizar análisis de hidrofobicidad se utilizó el algoritmo ANTIGENICITY PLOT (Toldo, 2007).

RESULTADOS

VII.1 Resultado I. Caracterización de epítomos inmunodominantes de *Spike* a través de *phage display*

VII.1.1 Evaluación de la reactividad de sueros de animales inoculados con virus UNAM 2001 y Mass

Para obtener suero inmune del hospedero original contra IBV y ser utilizado en el *biopanning* para la selección de mimótopos, se inocularon aves con el virus Mass y UNAM 2001. En la Fig. 13 se observa la afinidad que presentan los anticuerpos aviares con respecto a sus antígenos virales. La gráfica demuestra que los anticuerpos antivirales pueden presentar una respuesta cruzada contra los antígenos.

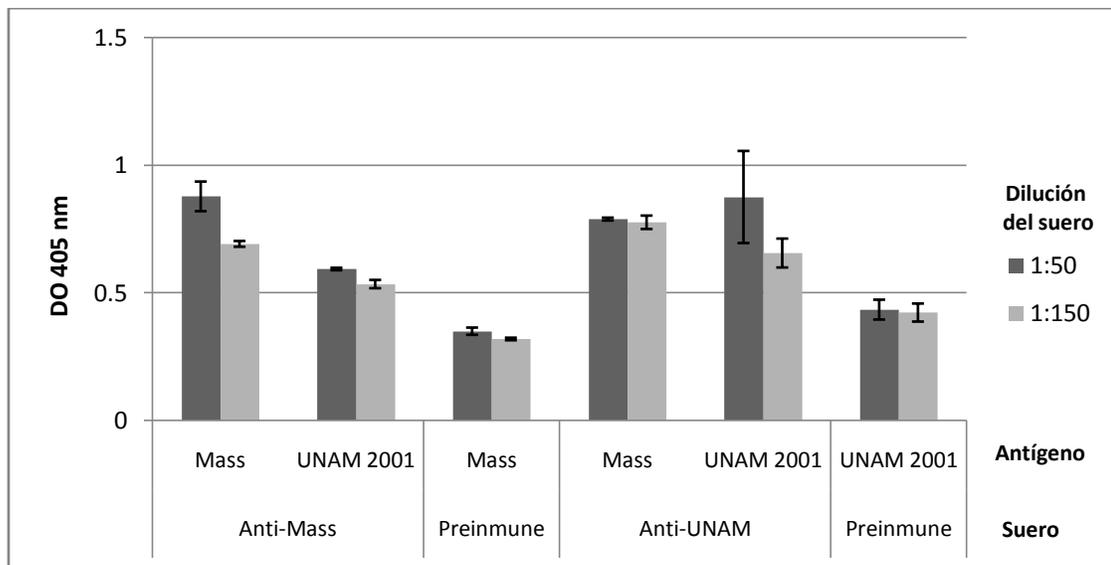


Fig. 13 Reactividad de anticuerpos policlonales de aves inoculadas con virus Mass y UNAM 2001

Para obtener anticuerpos hiperinmunes, se inocularon conejos con los mismos antígenos virales. En la Fig. 14 se puede observar la alta reactividad que presentaron estos anticuerpos con respecto al suero inmune aviar de la Fig. 13. En este ensayo también se presentó una reactividad cruzada entre los virus UNAM 2001 y Mass. En la gráfica se observa que el antígeno UNAM 2001 presentó una mayor afinidad por anticuerpos anti-Mass con un título hasta de 1:19,000 (Abs=0.84), mientras que contra su anticuerpo, presentó un título de 1:5,000 (Abs=0.98). El antisuero anti-Mass tuvo un título de 1:5,000 (Abs=0.98) al

presentar afinidad con el virus Mass. La reactividad que hubo entre el antisuero anti-UNAM 2001 con respecto al virus Mass fue la más baja con un título de 1:1,200 con una Abs=0.82.

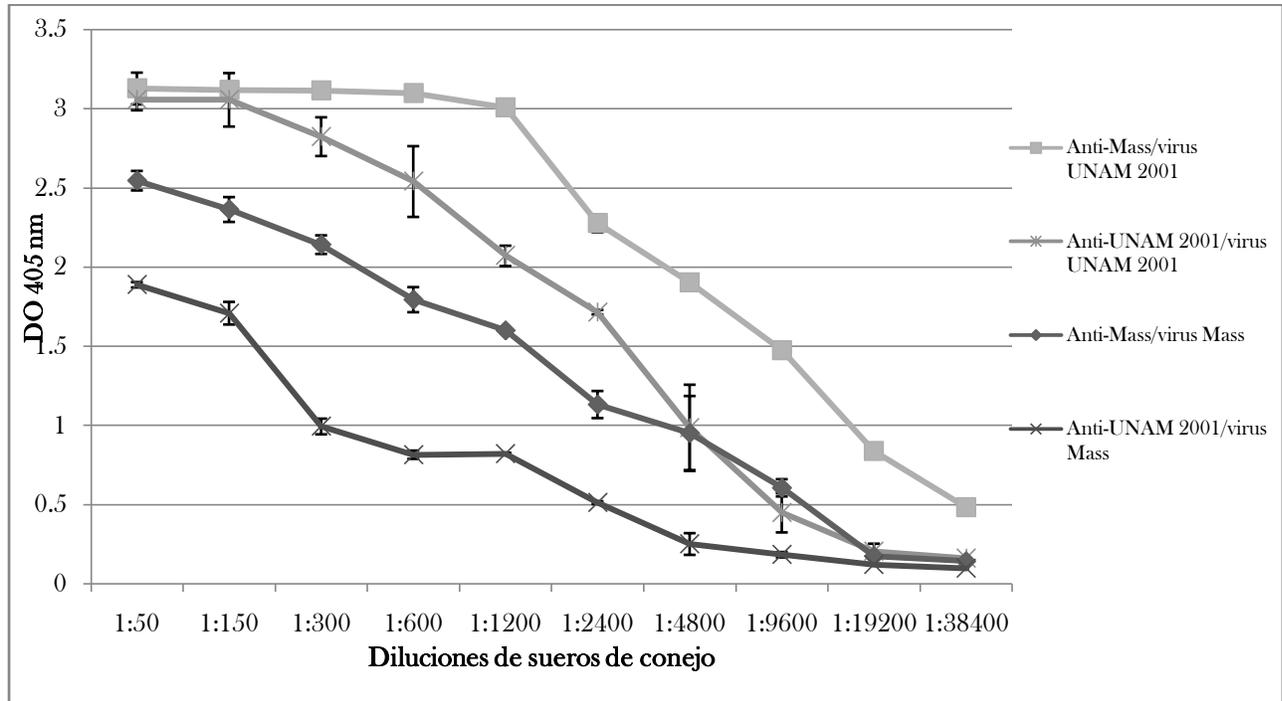


Fig. 14 Titulación de los antisueros de UNAM 2001 y Mass contra sus antígenos virales. El título más alto fue de 1:19,200 donde el antisuero anti-Mass presentó reactividad con el virus UNAM 2001. En la leyenda se observa cada antisuero con su respectivo antígeno (anticuerpos/virus) y en orden descendente con respecto a la titulación. Los sueros se consideraron positivo cuando sobrepasaron el valor de corte (Abs=0.56)

VII.1.2 Evaluación de la reactividad de sueros de animales inoculados con péptidos sintéticos

Para demostrar que la región altamente variable de S1 de IBV presenta sitios conservados que involucran aminoácidos críticos de epítomos, se utilizaron péptidos sintéticos que delimitaron a dicha región. Para esto, se alinearon secuencias de HVR de diferentes variantes de IBV California, las cuales, son parecidas filogenéticamente a las secuencias de S1 de UNAM 2001 (véase Fig. A1 del ANEXO I). Este alineamiento de variantes virales sirvió para obtener una secuencia consenso para el diseño de los péptidos [aún no se han identificado más variantes de UNAM 2001 para haber podido realizar esto y con UNAM 97 y BL-56 no existe una relación evolutiva (véase Fig. A1 del ANEXO I)].

Los péptidos se acoplaron a un acarreador (véase Fig. A4 del ANEXO I) y fueron usados para obtener anticuerpos anti-péptido en conejos. Estos anticuerpos seleccionaron mimótopos de la biblioteca

recombinante de 12 residuos. En el estudio se utilizaron conejos para obtener sueros hiperinmunes los cuales fueron evaluados en ensayos de ELISA (Fig. 15). También se inocularon estos péptidos en ratones pero no hubo una respuesta de anticuerpos eficiente. El péptido 103 (P103), cuya secuencia se encuentra en amino terminal de HVR, no indujo una respuesta humoral en conejos, sin embargo, con el péptido 138 (carboxilo terminal de HVR) se obtuvieron anticuerpos con densidades ópticas hasta 20 veces más que el suero preinmune (Fig. 15).

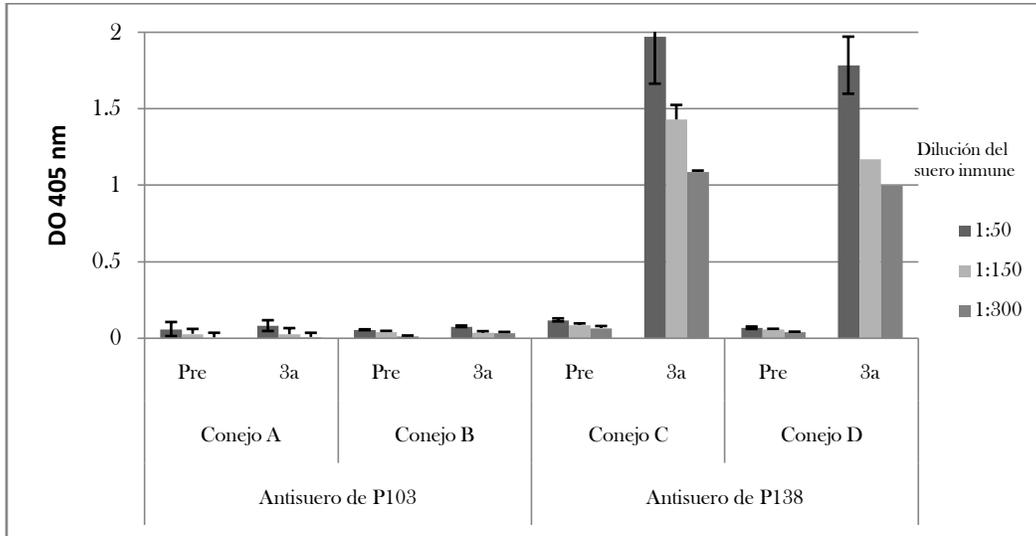


Fig. 15 Reactividad de sueros de conejos inoculados con el péptido 103 (N-ter de HVR) y péptido 138 (C-ter de HVR).

Los títulos del antisuero anti-P138 fueron de 1:2400 contra P138 y de 1:600 contra el péptido acoplado (Fig. 16a). Sin embargo, contra los virus UNAM 2001 y Mass, el suero anti-P138 no presentó reactividad (Fig. 16a). Los sueros anti-UNAM 2001 y anti-Mass no presentaron reactividad contra P138 libre o acoplado (datos no mostrados).

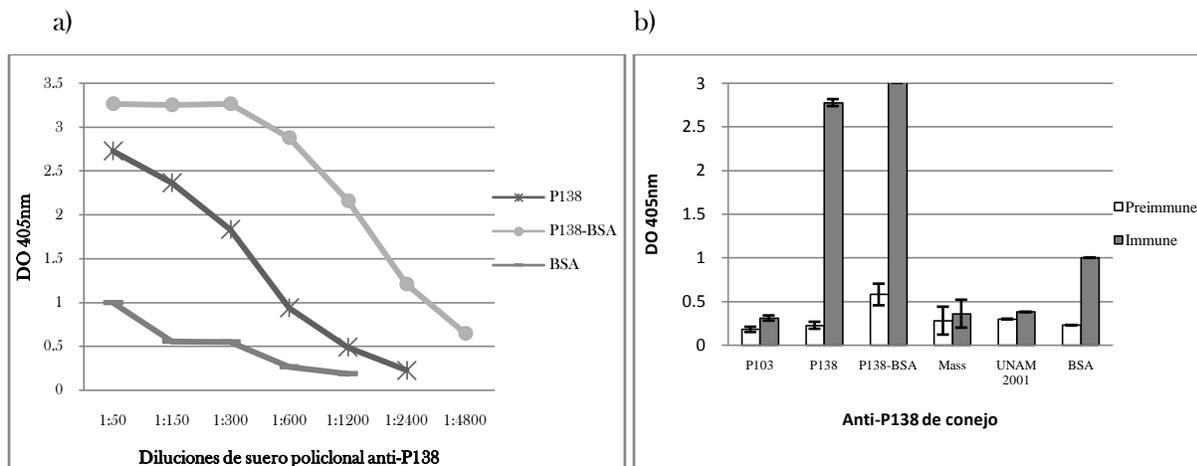


Fig. 16 (a) Curva de titulación del suero anti-P138 contra el péptido libre y acoplado y BSA (albúmina sérica). La positividad se consideró cuando la DO fue a igual a 0.56. (b) Reactividad de suero (dilución 1:50) de conejo inmunizado con P138. El anticuerpo solo reconoce al péptido libre (P138) y acoplado (P138-BSA) y no a los virus UNAM 2001 y Mass. Los valores se consideraron positivos cuando se rebasó la Abs=0.61.

VII.1.2.1 ELISA de antisueros de aves inoculadas con virus Mass y UNAM 2001 contra péptidos sintéticos

Para fundamentar aún más que el péptido sintético P138 contiene epítomos inmunodominantes, se realizó una ELISA con antisueros de aves inoculadas con Mass o UNAM 2001. Anteriormente se demostró que P138 no reaccionaba con suero antiviral de conejo (véase Fig. 16). Sin embargo, los antisueros de aves inoculadas con los virus demostraron tener alta reactividad. En la Fig 17 se observa que los antisueros reaccionaron con los péptidos acoplados a BSA con valores más altos de densidad óptica que con los péptidos libres e inclusive, que con los virus. El antisero anti-UNAM 2001 presentó mayor reactividad con P138-BSA.

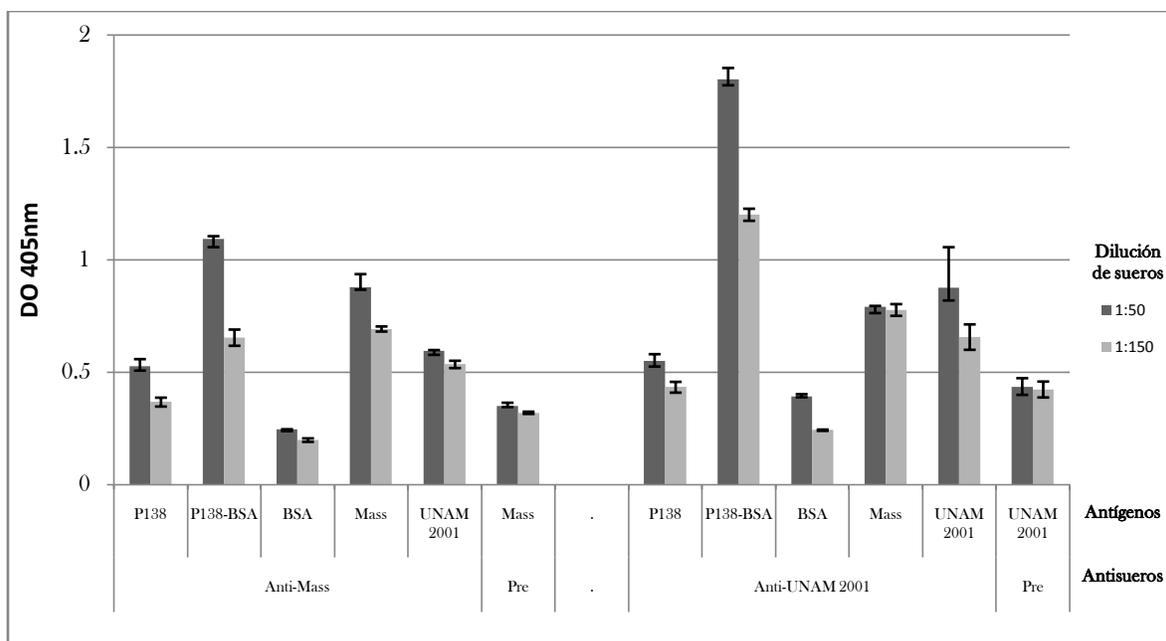


Fig. 17 Reactividad de antisuero de aves inoculadas con IBV Mass y UNAM 2001 con sus propios antígenos y con P138. Se consideró suero positivo cuando el valor de su densidad óptica era mayor al valor de corte del suero preinmune (Pre, suero preinmune de Mass con Abs=0.35 y suero preinmune de UNAM 2001 con Abs =0.47).

VII.1.3 Purificación de inmunoglobulinas

El objetivo de este experimento fue purificar anticuerpos específicos de los sueros policlonales antivirales de aves y conejos, así como de sueros anti-P138, para obtener una mayor concentración de inmunoglobulinas específicas a los virus. En *biopanning*, es necesario tener un concentrado de hasta 15 μg de la proteína para la selección de mimótopos de fagos.

VII.1.3.1 Inmunoglobulinas Y anti-Mass de aves

En la purificación de inmunoglobulinas Y (IgY, no se une a receptores Fc como IgG) de aves inoculadas con el virus Mass se llegaron a tener una concentración de 3.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen de 1.5 ml c/u (principalmente en las fracciones 13 y 15, véase Tabla A4 en ANEXO II). No se utilizó el antisuero anti-UNAM 2001 por el bajo volumen obtenido y proporcionado por el Departamento de Aves. Una vez purificada la IgY se procedió a evaluar la reactividad con los antígenos virales (Fig. 18). En este ensayo se utilizaron también otros virus (Conn, de distribución mundial y UNAM 97 y BL 56, de distribución local) para evaluar la reactividad cruzada. Las fracciones 13 y 14 obtenidas de la purificación de IgY de sueros inmunes presentaron afinidad con todos los virus (excepto con la cepa mexicana BL 56).

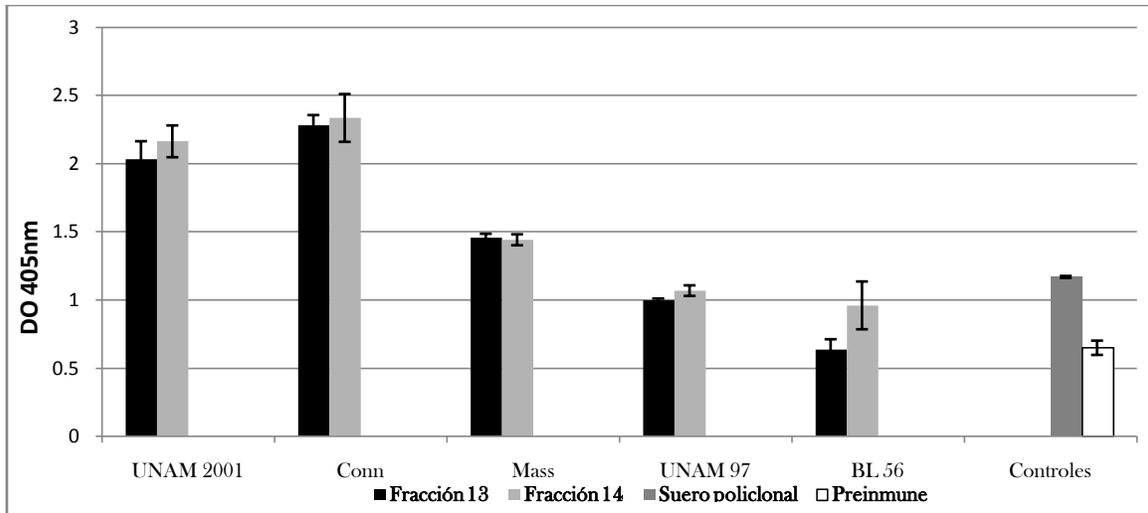


Fig. 18 Reactividad cruzada de las fracciones de IgY (5 µg de proteína) obtenidas de suero policlonal anti-Mass contra varios aislados de IBV (UNAM 2001, Conn, Mass, UNAM 97 y BL 56). Se consideraron los valores positivos cuando estaban por arriba del valor de corte (Abs =0.65). Los controles están diluidos 1:50.

VII.1.3.2 Inmunoglobulinas G anti-UNAM 2001 de conejos

Para la purificación de IgG de conejos, se utilizó el antisuero anti-UNAM 2001 puesto que este virus es endémico mexicano y aún no se han hecho investigaciones para el desarrollo de una vacuna específica. El concentrado de la IgG fue aproximadamente de 2 µg/µl obtenida por cromatografía de afinidad de forma manual y en un solo paso se obtuvo una sola fracción. En la Fig. 19 se presenta la reactividad de IgG anti-UNAM 2001 fue evaluada en ELISA en donde presentó una respuesta cruzada con todos los antígenos virales en estudio (como IgY anti-Mass de aves, excepto que IgG anti-UNAM 2001 tuvo afinidad por BL 56).

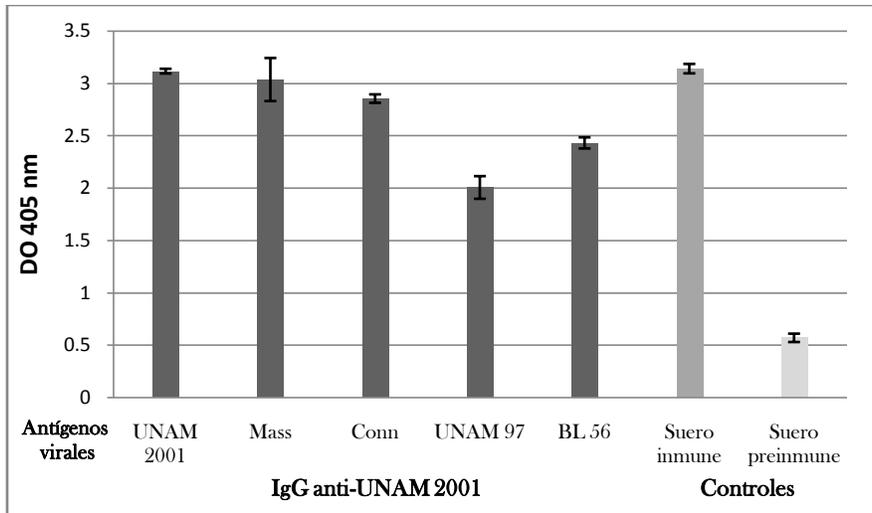


Fig. 19 Reactividad cruzada de la IgG de conejos inoculados con la cepa UNAM 2001 contra el virus endémico en cuestión, Mass, Conn, UNAM 97 y BL 56. Se utilizaron 5 µg del anticuerpo secundario en ELISA. La positividad de las reacciones se consideró cuando sobrepasaban el valor de corte igual a una Abs=0.539.

VII.1.3.3 Inmunoglobulinas G anti-P138 de conejos

Una vez reconocido que el P138 es inmunogénico y antigénico, se procedió a purificar su anticuerpo de la misma forma que las inmunoglobulinas antivirales. Se llegó a obtener hasta 1.192 µg/µl. La IgG del suero anti-P138 resultó, como se esperaba, con alta reactividad contra de su propio antígeno peptídico con una Abs>2 (Fig. 20).

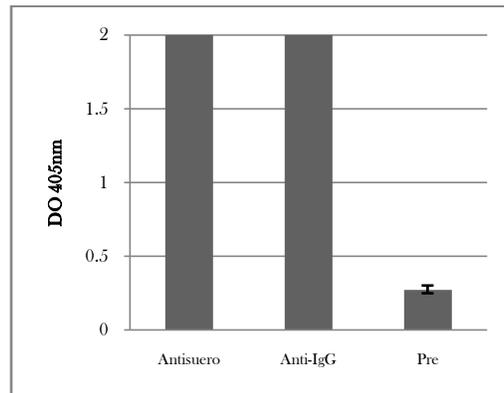


Fig. 20 Inmunoensayo de anticuerpo IgG de conejo contra P138. La densidad óptica de anti-IgG de P138 es 11 veces mayor que el suero preimmune (Pre).

VII.1.4 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas en el biopanning

VII.1.4.1 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas antivirales de aves

Para seleccionar específicamente péptidos miméticos de epítomos de Mass se utilizó la IgY anti-Mass en el *biopanning*. Se llegó a tener en la tercera ronda una población de clonas de fago de 10^5 ufp. Para poder identificar los aminoácidos críticos de los mimótopos se escogieron 18 clonas para secuenciar su ADN y, al identificar los aminoácidos, solo el 22% (cuatro clonas) compartieron el motivo Gln-Tyr-Gly-Lys-Phe (QYGKF) y el 11% presentaron dos aminoácidos críticos Gln-Tyr (una clona presentó en vez de Tyr, el aminoácido homólogo Phe) en su secuencia como se observa en la Fig. 21a. Las clonas 3 (su secuencia se presentó dos veces más en otras clonas), 8, 7 y 9 que tuvieron estos motivos, presentaron afinidad hacia la IgY (Fig. 21b).

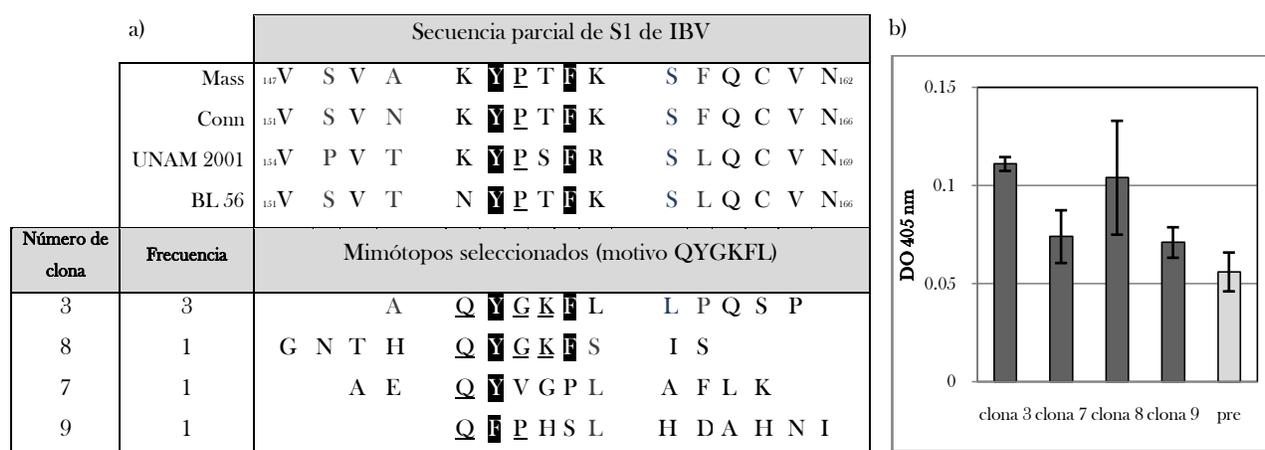


Fig. 21 a) Comparación de las secuencias de aminoácidos de los mimótopos seleccionados (motivo QYGKFL) por IgY de antisuero de Mass y la secuencia parcial de S1 de variantes de IBV. Las letras sombreadas representan los aminoácidos conservados, mientras que, las subrayadas representan los aminoácidos con polaridad similar. b) Reactividad de IgY de suero anti-Mass ($5 \mu\text{g}$) con las clonas individuales con el motivo. La clona 3 también se utilizó en el control negativo (pre, suero preinmune) y se consideraron valores positivos arriba de 0.6.

Para identificar los epítomos de IBV, se realizó una alineación de secuencias de aminoácidos de S1 de diferentes variantes del virus y de los mimótopos seleccionados (Fig. 21a). Resultó que la secuencia lineal QYGKF se traslapó con la secuencia de Mass 151-KYPTFK-156 que se localiza río abajo de HVR-2. La Tyr y Phe de las clonas seleccionadas se mantiene conservada en S1, incluso, de otras variantes de IBV. Algunos aminoácidos de las clonas (Gln, Lys y Leu) son sustituidos por otros fisicoquímicamente similares en la secuencia de IBV (Lys/Asn, Thr/Ser y Lys/Arg).

VII.1.4.2 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas antivirales de conejos

El *biopanning* con IgG de conejos inoculados con UNAM 2001 se procedió de la misma forma anteriormente descrita. Se llegó a obtener de 10^6 en la primera ronda hasta 10^9 ufp en la tercera ronda durante el curso del tamizado. De las 18 clonas que se secuenciaron, seis presentaron el motivo Tyr-Pro-x-Tyr-x-x-Leu (YPxYxxL, donde x denota cualquier aminoácido). Los aminoácidos Tyr, Pro, Tyr y Leu se presentaron en todos los péptidos miméticos (Fig. 22a). Las clonas 2 y 8 resultaron ser las más antigénicas con más del doble de densidad óptica (DO>1) que el suero preinmune (Fig. 22b).

Para poder identificar los epítomos del virus UNAM 2001, se realizó una comparación entre secuencias de aminoácidos de mimótopos y de la secuencia parcial de S1 de IBV. Se observó que los primeros se alineaban con la secuencia 159-YPSFRSL-165 de UNAM 2001, así como en otras variantes virales (Fig. 22a).

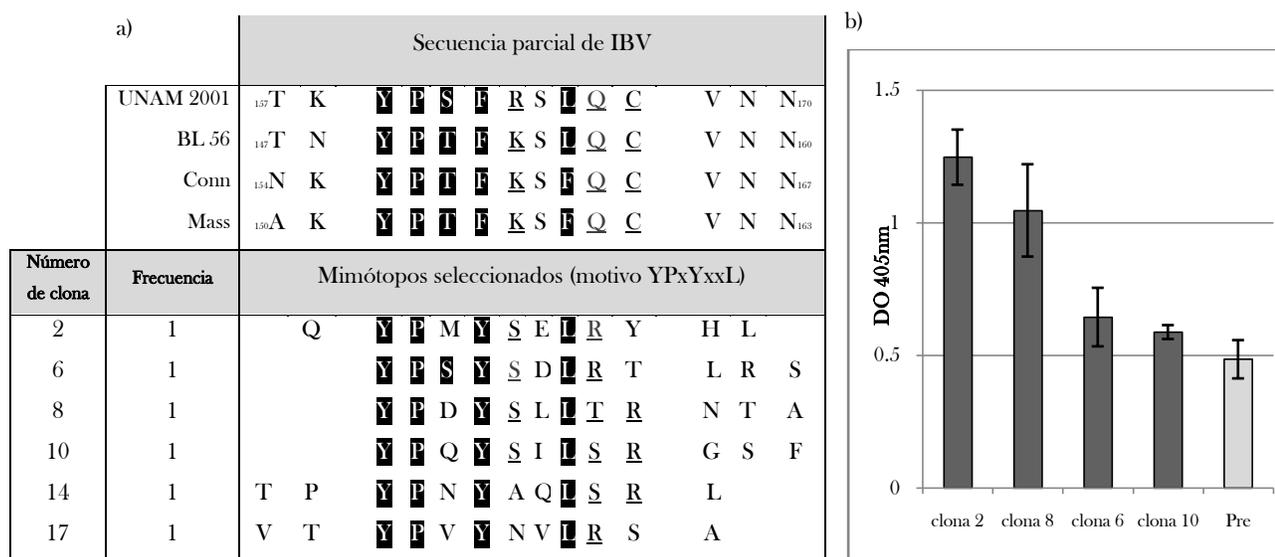


Fig. 22 a) Comparación de las secuencias de aminoácidos de los mimótopos (motivo YPxYxxL) seleccionados por IgG de suero de conejos inoculados con UNAM 2001 y la secuencia parcial de S1 de variantes de IBV. Las letras sombreadas representan los aminoácidos conservados, mientras que las subrayadas, representan los aminoácidos con polaridad en común. b) Reactividad de IgG de suero anti-UNAM 2001 contra clonas individuales seleccionadas. El suero preinmune se evaluó contra la clona 2 en ELISA y se consideró que después de su valor de corte (Abs=0.55) serían los valores positivos.

VII.1.4.3 Selección de mimótopos por inmunoglobulinas anti-P138 de conejos

En el *biopanning* con IgG de conejos inoculados con P138 se obtuvo un eluido con una población de 10^9 clonas de fago. En la tercera ronda observamos que las secuencias QPTGPL, QATGPL y QLVRPL estaban siendo seleccionadas doblemente en una población de 18 clonas, razón por la cual, decidimos

hacer una cuarta ronda. Es por ello que 58 clonas fueron secuenciadas (Fig. 23a) y de las cuales el 34% (20 clonas) expresaron el motivo Gln-x-Thr-Gly-Pro-Leu-x-Phe (QxTGPLxP). Las clonas resultaron ser antigénicas en pruebas de ELISA (Fig. 23b).

a)

Número de clona	Frecuencia	Secuencia de aminoácidos
		Secuencia parcial de S1 (P138) de IBV*
		¹³⁸ M K S N G T G P S D L F Y N L T V ¹⁵⁴
		Mimótopos seleccionados (motivo QxTGPLxP)
6	1	I P G P - - L P E W P G
3	1	Q P H <u>P</u> P G P - - L E R
57	2	L <u>P</u> A G P - - L T S G P
8	1	I V S P - - L Y A W A
21	6	L P I <u>P</u> L V R P - - L S F
23	1	Y <u>P</u> A N Y P - - L S F
55	1	I S I P A F P - - L F E P
56	1	F <u>P</u> E L K L - - L N S V G
41	1	A K S S L H - - L P P A P
9	1	A K S I P W - - L L S A N
4	1	G G Y L S G - - L Y P H K
29	1	D H M P V F L R G - - L T
19	1	E Q V L T G L R P - - L A R
24	1	A G K V G A S P P - - L Y

b)

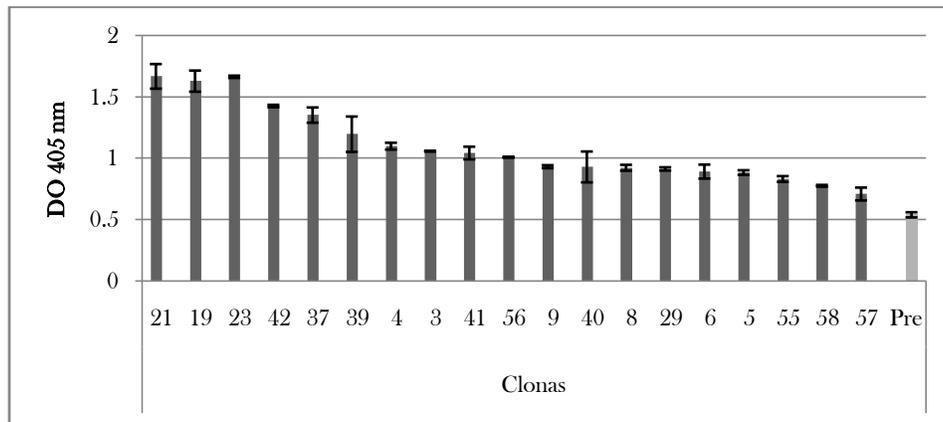


Fig. 23 (a) Comparación de la secuencia para parcial de S1 de IBV (* variante de California, CA 88) con la secuencia de mimótopos con motivo QxTGPLxP seleccionados por la IgG de suero de conejo inoculado con P138. En sombreado se encuentran los residuos de las clonas seleccionadas homólogos al epítipo de P138, mientras que en subrayado se representan los residuos que son polarmente similares. (-) denota que no hubo sustituciones de Ser y a Asp en la secuencia de las clonas. (b) Reactividad del suero anti-P138 contra cada una de las clonas seleccionadas. El preimmune no reaccionó con la clona 21.

En la Fig. 23a se observa que la secuencia que se seleccionó múltiples veces por el anti-P139 fue LPIPQLVRPLSF y fue la que presentó mayor reactividad contra el antisuero. El motivo QxTGPLx F de los mimótopos seleccionados por anti-IgG de P138 se alinearon con la secuencia ¹⁴¹NGTGPSDLLY¹⁵⁰ del péptido (secuencia parcial de S1).

VII.1.5 Inmunogenicidad de todos los mimótopos seleccionados por anticuerpos de péptidos y virus

VII.1.5.1 Mimótopos de epítomos de P138 como inmunógenos

Una vez comprobada la antigenicidad de las clonas con motivo QxTGPLx F, fue necesario verificar si en verdad eran inmunogénicas. Las clonas no fueron utilizadas en un ensayo de protección de aves porque se requiere un volumen y titulación altos del eluido de la última ronda, con lo cual, no se contaba en ese momento. Por lo tanto, el experimento se realizó en ratones que fueron inoculados por las clonas 21 (LPIPQLVRPLSF) y 19 (EQVLTGTRPLAR) porque presentaron mayor afinidad hacia el anticuerpo anti-P138 (véase Fig. 23b). Se purificaron las inmunoglobulinas de ratón y se evaluaron en ELISA contra del péptido acoplado (P138) y UNAM 2001 (Fig. 24). Los antisueros anti-clonas fueron reconocidos por el P138 y por el virus.

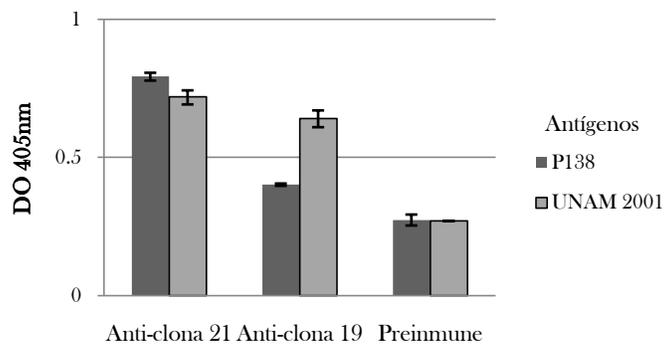


Fig. 24 Reactividad de IgG de suero de ratones inoculados con las clonas 21 y 19 contra el péptido libre y el virus. Los valores positivos están arriba del valor de absorbancia 0.29.

VII.1.5.2 Mimótopos de epítomos de virus como inmunógenos: Ensayo de protección

En experimentos anteriores se observó que las clonas que desplegaron los mimótopos con motivo QYGKFL (seleccionadas con anti-IgY de virus Mass) y YPxYxxL (seleccionadas con anti-IgG de virus UNAM 2001) fueron antigénicas, es decir, los anticuerpos de aves y conejos inoculados con Mass y UNAM 2001, respectivamente, presentaron afinidad hacia estos péptidos miméticos. Ahora faltaba comprobar si los mimótopos podrían despertar una respuesta inmunológica. Para esto se utilizaron aves libres de patógenos inoculadas con las clonas con mimótopos de epítomos virales.

En la Tabla 3 se resume el esquema de inmunización. Las aves fueron clasificadas en 12 grupos, cada uno con cinco o seis aves. Durante el pre-desafío, el grupo 1 fue utilizado como control negativo al inocularlo con PBS 1x (no fue ni inmunizado ni infectado; se sacrificó antes del desafío con el virus UNAM 2001); el grupo 2 funcionó también como negativo en esta primera prueba (después fue infectado en el desafío). A los grupos 3 y 4 se les suministraron subcutáneamente 100 µl de la vacuna emulsionada en la parte dorsal del cuello del ave (el grupo 3 se sacrificó antes del desafío para realizar estudios histopatológicos). Al grupo 5 y 6 se le suministraron 1×10^{13} clonas de fago que fueron seleccionadas por IgG (motivo YPxYxxL) e IgY (motivo QYGKF), respectivamente, del eluido total de tercera ronda, mientras que al grupo 7 se le inoculó una mezcla de baja concentración de clonas seleccionadas por IgG (5×10^{12} ufp) más IgY (5×10^{12} ufp) del eluido de tercera ronda. De igual forma, el grupo 8 recibió la mezcla de ambos eluidos de tercera ronda (clonas seleccionadas por anticuerpos IgG e IgY), pero en alta concentración (1×10^{13} ufp). Del grupo 9 al 12, se les suministraron clonas aisladas en un volumen de 600 µl por ave con un título de $1 \times 10^{12-13}$ ufp. Al grupo 9 se le inoculó la clona 2 (secuencia **Y P M Y S E L**) seleccionada por IgG de conejos inoculados con UNAM 2001, mientras que al grupo 10 le fue suministrado la misma clona, pero combinada con la clona 6 (**Y P S Y S D L**), 8 (**Y P D Y S L L**) y 10 (**Y P Q Y S I L**), también seleccionadas por IgG. Los últimos grupos, 11 y 12, fueron inoculados con la clona 8 (QYGKFL) y la mezcla de la misma clona con la clona 3 (QYGKFS), respectivamente, ambas seleccionadas por la IgY de aves inoculadas con el virus Mass. De cada grupo se obtuvo suero inmune para ser evaluado en ELISA (Fig. 25). Se observó que las clonas individuales seleccionadas con IgG anti-UNAM 2001 e IgY anti-Mass (grupo 9, 10, 11 y 12) fueron más reactivas con UNAM 2001 que con todo el eluido de tercera ronda (grupo 5, 6, 7 y 8).

Tabla 3 Esquema de inmunización de aves con mimótopos				
Grupos de aves	Inmunógenos ¹	Desafío con cepa UNAM 2001 ²	Individuos sanos después del desafío (sanos/enfermos) ³	% de protección ⁴
1	Búfer salino de fosfato	No ⁵	-	-
2	Búfer salino de fosfato	Sí	2/5	- ¹⁵
3	Vacuna comercial ⁶	No ⁵	-	-
4	Vacuna comercial	Sí	0/4	0
5	Clonas IgG de eluido de 3ª ronda ⁷	Sí	2/4	50
6	Clonas IgY de eluido de 3ª ronda ⁸	Sí	2/4	50
7	Mezcla de clonas IgG+IgY de eluido de 3ª ronda, menor concentración ⁹	Sí	1/4	25
8	Mezcla de clonas IgG+IgY de eluido de 3ª ronda, mayor concentración ¹⁰	Sí	0/4	0
9	Clona IgG 2 ¹¹	Sí	1/4	25
10	Clonas IgG 2, 6, 8 y 10 ¹²	Sí	3/4	75
11	Clona IgY 3 ¹³	Sí	3/4	75
12	Clonas IgY 3 y 8 ¹⁴	Sí	1/4	25

¹ Los refuerzos fueron a los 15 y 30 días después de la primera inmunización. Los antisueros del segundo refuerzo fueron evaluados por ELISA (Fig. 25a)

² El desafío se realizó 40 días después de la primera inmunización. Se suministró una dosis de 1x10⁴ EID₅₀ (100 µl) vía ocular

³ Se consideraron aves sanas cuando en los estudios histopatológicos no presentaban nefritis, hiperplasia linfóide peribronquial o neumonía intersticial linfocitaria

⁴ Es el porcentaje en que las vacunas (comercial y mimótopos) no permitieron el desarrollo de la enfermedad. Se calculó a través de la fórmula (individuos sanos/total de individuos) x 100

⁵ Estos grupos de aves se sacrificaron antes del desafío

⁶ Vacuna heteróloga (Mass y Conn) emulsionada de AVIMEX[®] (broni-mexTM) inoculada de forma sub-cutánea en parte dorsal superior de las aves de acuerdo a las especificaciones del fabricante

⁷ Clonas de fago del eluido de tercera ronda (1x10¹³ ufp) seleccionadas por IgG de conejo inoculado con virus UNAM 2001

⁸ Clonas de fago del eluido de tercera ronda (1x10¹³ ufp) seleccionadas por IgY de conejo inoculado con virus Mass

⁹ Clonas de fago del eluido de tercera ronda (5x10¹² ufp) seleccionadas por IgG de conejo inoculado con virus UNAM 2001 mezcladas con clonas de fago de tercera ronda (5x10¹² ufp) seleccionadas con IgY de aves inoculadas con el virus Mass

¹⁰ Clonas de fago del eluido de tercera ronda (1x10¹³ ufp) seleccionadas por IgG de conejo inoculado con virus UNAM 2001 mezcladas con clonas de fago (1x10¹³ ufp) seleccionadas con IgY de aves inoculadas con el virus Mass.

¹¹ Clona 2 seleccionada por IgG de conejo inoculado con virus UNAM 2001

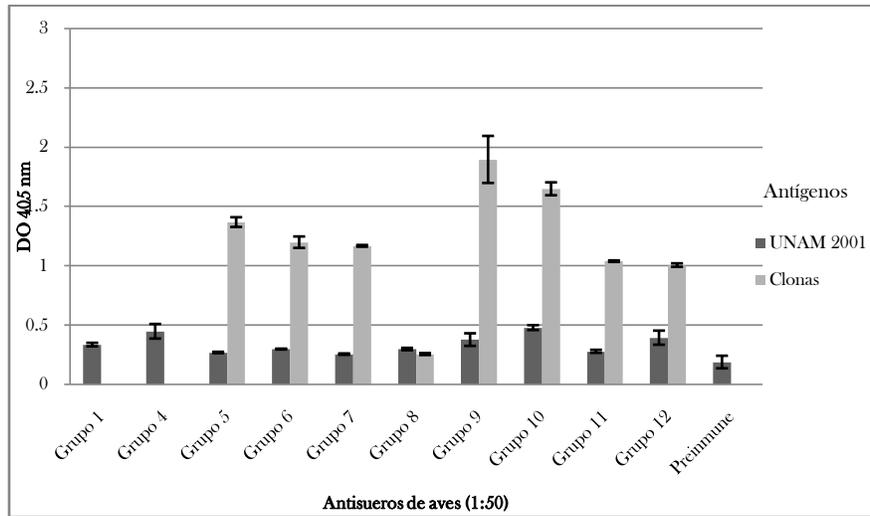
¹² Clonas 2, 6, 8 y 10 seleccionadas por IgG de conejo inoculado con virus UNAM 2001

¹³ Clona 8 seleccionada por IgY de aves inoculadas con virus Mass

¹⁴ Clonas 3 y 8 seleccionadas por IgY de aves inoculadas con virus Mass

¹⁵ Estas aves no fueron inmunizadas (no protegidas) ya que es el control positivo a la enfermedad

a)



b)

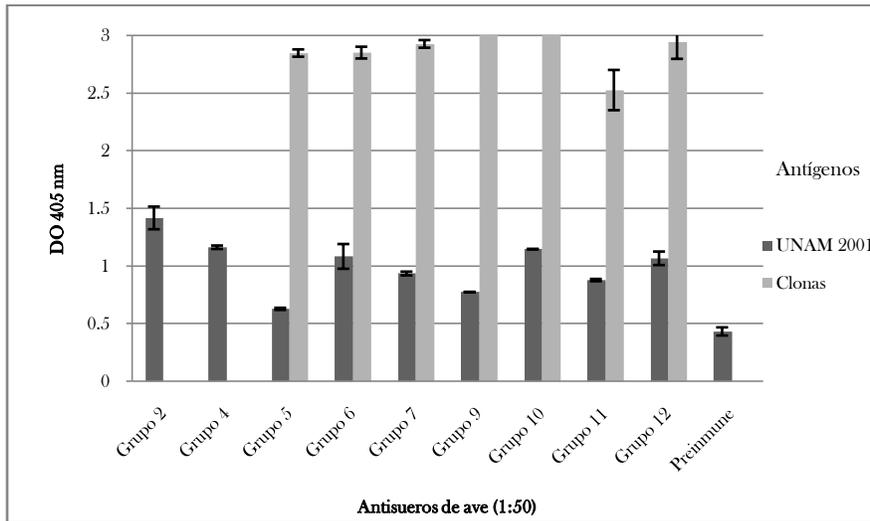


Fig. 25 Reactividad de los sueros aviare anti-clonas con virus UNAM 2001 y clonas de fago (motivo YPxYxxL y QYGKF). a) Ensayo pre-desafío de ELISA con sueros de aves que fueron inoculadas con la vacuna y clonas antes de ser infectadas con el virus UNAM 2001 (positividad > 0.24). b) ELISA con sueros anti-clonas de aves infectadas con el virus UNAM 2001 y sacrificadas cuatro días después del desafío (post-desafío). El grupo 1 y 3 se sacrificaron antes de ser infectados con el virus. El grupo 8 no se consideró en este ensayo ya que su suero no reaccionó con sus antígenos en el pre-desafío. Se consideró positivo cuando los valores de absorbancia sobrepasaban los 0.5.

A los 40 días, las aves fueron infectadas con el virus UNAM 2001 con una dosis de 1×10^4 DIE₅₀ en un volumen de 100 μ l inoculado ocularmente (vía de entrada natural del virus). La obtención de sangre fue obtenida a los cinco días post-desafío. Los sueros fueron evaluados en pruebas de inmunoensayo en microplacas sensibilizadas con clonas o con el virus UNAM 2001 como se observa en la Fig. 25b. En esta gráfica se observó que los mimótopos produjeron altos títulos de anticuerpos que incluso reconocieron al

virus endémico mexicano. Se observó también que el antisuero de aves inmunizadas con la vacuna comercial presenta una reactividad con una absorbancia similar a los sueros anti-clonas.

Para poder evaluar la protección de aves enfermas ante los mimótopos (estudios preliminares), se realizó un examen histopatológico de tráquea, pulmón y riñón a cuatro aves sacrificadas de cada grupo en el quinto día post-infección. El trabajo fue realizado por personal del Departamento de Aves de la FMVZ, UNAM. Ningún ave murió a causa de la infección, pero se demostró que las tráqueas de aves enfermas presentaron una infiltración mononuclear e hiperplasia epitelial leve y sus pulmones desarrollaron neumonía intersticial. Los riñones tuvieron infiltración linfocítica y nefritis (Tabla 3). En este mismo estudio, el grupo 2 (aquel grupo de aves que no fue inmunizado y que se infectó con UNAM 2001 en el desafío) presentó dos aves enfermas de cinco infectadas. El grupo 4 (inmunizado con la vacuna comercial) no fue protegido (0/4). Las clonas del eluido de tercera ronda protegieron en un 50% (2/4). La clona individual 2 (seleccionada con IgG de conejo inoculado con UNAM 2001) y las clonas 3 y 8 (seleccionadas con IgY de aves inoculadas con Mass) protegieron en un 25% (un ave resultó protegida). Sin embargo, aquellas aves que fueron inmunizadas con las clonas 2, 6, 8 y 10 (con motivo YPxYxxL) fueron protegidas en un 75%. La clona 3, seleccionada con IgY de aves inoculadas con Mass, protegió a tres de cuatro aves infectadas con el virus UNAM 2001 (75% de protección).

VII.1.6 Localización de los epítomos inmunodominantes en la secuencia de S1 de Spike

Para determinar la posición de los epítomos inmunodominantes en la secuencia de S1 de *Spike* de IBV, se utilizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos entre diversas variantes de virus de bronquitis infecciosa. Se encontró que los epítomos o el clúster inmunodominante se encuentra entre los aminoácidos 141 y 165 de acuerdo a la numeración de la secuencia de UNAM 2001 (o 139-158 en Mass) (Fig. 26). Estos determinantes se encontraron en el primer tercio de S1 de *Spike*. Se observó que los epítomos encontrados a través de los mimótopos seleccionados se localizaron río debajo de HVR. En el alineamiento se utilizó también la secuencia de D207, una cepa usada por Kant *et al*, 1992, en donde demostró residuos críticos (no el epítomo completo) a través de variantes resistentes a anticuerpos monoclonales. Dos de los aminoácidos se encontraron entre el His132 (sustituido por Tyr en las variantes) y Leu149 (sustituido por Ser), al que denominaron sitio antigénico D. Uno de los epítomos encontrados en nuestros experimentos a través de mimótopos seleccionados con anti-P138 se encontró entre el aminoácido 141 y 150, el cual se alinea con el sitio antigénico E de Kant. Los mimótopos seleccionados con anti-UNAM y anti-Mass se encontraron ocho aminoácidos debajo del primer epítomo.

VII.2. Resultado II: Análisis comparativo entre epítomos inmunodominantes de la subunidad 1 de IBV y de SARS-CoV

VII.2.1 Comparación del dominio inmunodominante de S1 de IBV encontrado por phage display con epítomos de S1 de SARS-CoV

Para evaluar posicional y estructuralmente a los epítomos inmunodominantes de *Spike* de IBV obtenidos por *phage display* y para compararlos con los sitios antigénicos homólogos de otro coronavirus, se realizó una serie de alineamientos a nivel de aminoácidos con secuencias de la proteína *Spike* del virus humano SARS-CoV. El alineamiento de la secuencia de los epítomos con IBV con sus sitios homólogos en SARS-CoV presentó un 20% de identidad y la comparación de la proteína entera (más de 1100 aa para ambos virus), hasta un 26% (datos obtenidos y no mostrados del programa ALIGN).

Al realizar un alineamiento múltiple de secuencias parciales de S1 con CLUSTAL W (Fig. 27), se demostró que el epítopo 1 de IBV (141-150 de la secuencia UNAM 2001 o 139-143 de Mass) mimetizado por el motivo QxTGPLxF de las clonas se alineó con la secuencia 179-188 de la subunidad 1 del virus SARS. Por otra parte, el epítopo 2 (159-165 de UNAM 2001 o 152-158 de Mass) mimetizado por los motivos YPxYxxL y QYGKFL se alineó con la secuencia 197-203. Estas secuencias del virus humano se encontraron en la parte media del sitio inmunodominante II (SI2, aa 171-224) determinado por el grupo de He (2004) a través de PEPSCAN.

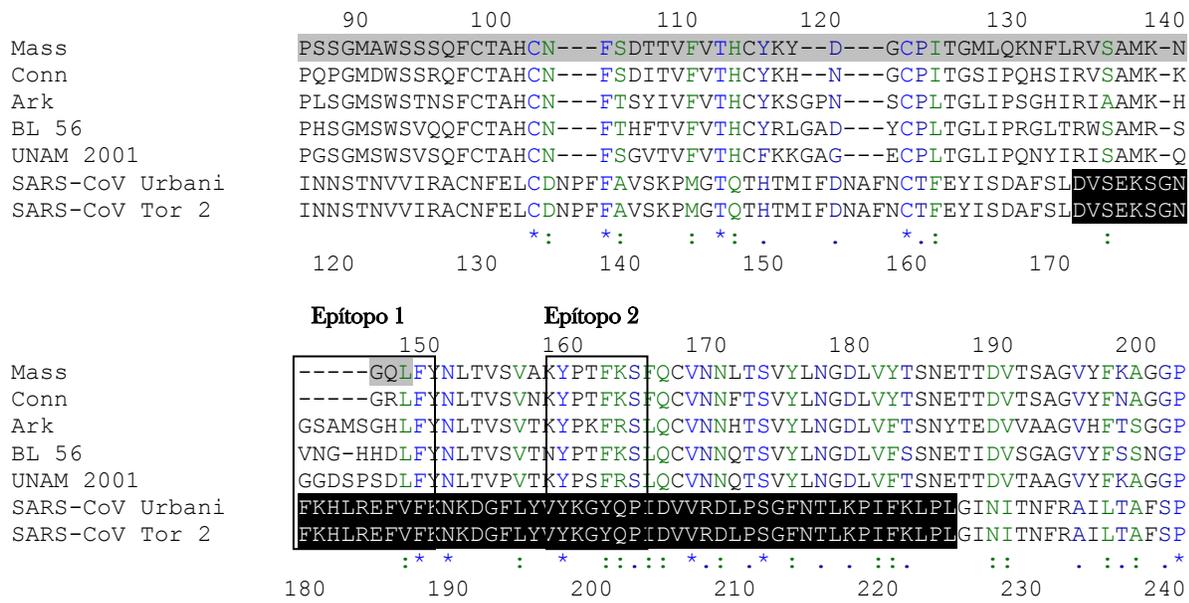


Fig. 27 Alineamiento entre las secuencias parciales de S1 de variantes de IBV y de SARS-CoV. Se señalan los dos epítomos (dominio inmunodominante) de IBV (en recuadros) y el sitio inmunodominante II (He et al, 2004) de SARS-CoV (sombreado negro). La región HVR de Mass se muestra en sombreado gris. Arriba se muestra la numeración de IBV basada en la secuencia de UNAM 2001 mientras abajo se muestra la numeración de los aminoácidos de SARS-CoV.

VII.2.2 Análisis de la estructura tridimensional del sitio inmunodominante de IBV

Para poder inferir la posible estructura tridimensional de los epítomos de la proteína *Spike* del virus de bronquitis infecciosa, se realizó una comparación del perfil hidrofílico de los primeros 224 aminoácidos (S1 de UNAM 2001 está secuenciada parcialmente hasta los primeros 224 aminoácidos en N-ter) de la subunidad 1 de UNAM 2001, Mass y SARS-CoV (Fig. 28). Este análisis permitió detallar más sobre la topografía proteica de S1 de *Spike* e identificar qué zonas son más hidrofílicas y, por lo tanto, más expuestas en la superficie de la glicoproteína. En la Fig. 28 se muestran gráficamente tres tipos de análisis de hidrofiliicidad: KD (Kyte and Doolittle, 1982), HW (Hopp y Woods, 1981) y SE (Jannin *et al*, 1978) en el que los valores encontrados por arriba del eje son hidrofílicos o probablemente expuestos en la superficie de la proteína.

Las secuencias parciales de S1 traslapadas de ambos IBV en donde se muestra el dominio inmunodominante encontrado por *phage display* (141-165, de acuerdo a la numeración de UNAM 2001). Se observó que en la C-ter de S1 de UNAM 2001 y Mass (en donde se encontró nuestro dominio) hay una mayor coincidencia de aminoácidos que en la parte N-ter. En el recuadro se muestran los aminoácidos hidrofílicos y expuestos a la superficie de la proteína. Se observó que los aminoácidos de nuestros epítomos tuvieron un valor negativo en KD y >0.6 en SE (*Surface Exposure*), lo que significa que es probable que

estén expuestos. En la Fig.28b se muestran los aminoácidos de S1 de SARS-CoV que coinciden con el sitio inmunodominante y que aparentemente presentaron características hidrofílicas semejantes.

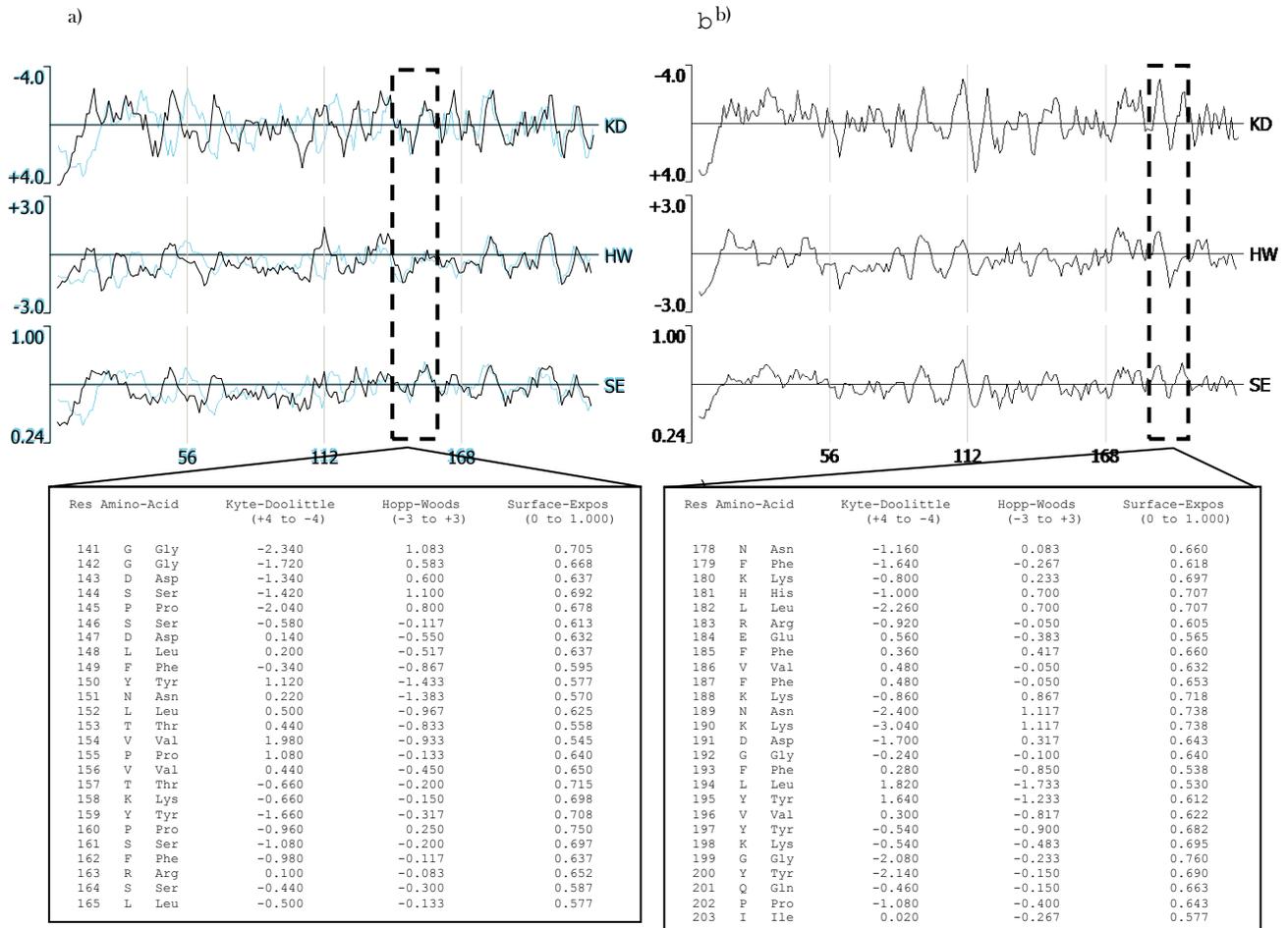


Fig. 28 Análisis de hidrofiliidad para la secuencia parcial S1 de a) Mass (línea gris), UNAM 2001 (línea negra) y b) SARS-CoV. Se observa el sitio inmunodominante de IBV encontrado por phage display y su sitio homólogo en SARS-CoV en recuadros. Se muestran los valores de los tres métodos para cada aminoácido del dominio en UNAM 2001 (esta secuencia se utilizó porque no existen espacios dentro de la secuencia para el primer epítipo) y en SARS-CoV. Cabe destacar que cada uno de estos análisis de hidrofiliidad se toma en cuenta el promedio del valor de seis residuos y se grafica con el aminoácido de en medio.

Después de saber que nuestro sitio inmunodominante presentó residuos potencialmente expuestos en la superficie de *Spike* (además de determinar su estructura secundaria, véase ANEXO III), se decidió hacer un análisis de su probable estructura tridimensional (Fig. 29). La subunidad 1 de *Spike* del virus SARS se utilizó porque ya se tiene un cristal de su estructura en el PBD (*SwissProt*: P59594). Dentro de la estructura, la secuencia 171-203 de SARS-CoV (secuencia que alinea con el sitio inmunodominante encontrado por *phage display* en IBV) presentó en sus extremos estructuras no secundarias de tipo espiral al azar (*coil*).

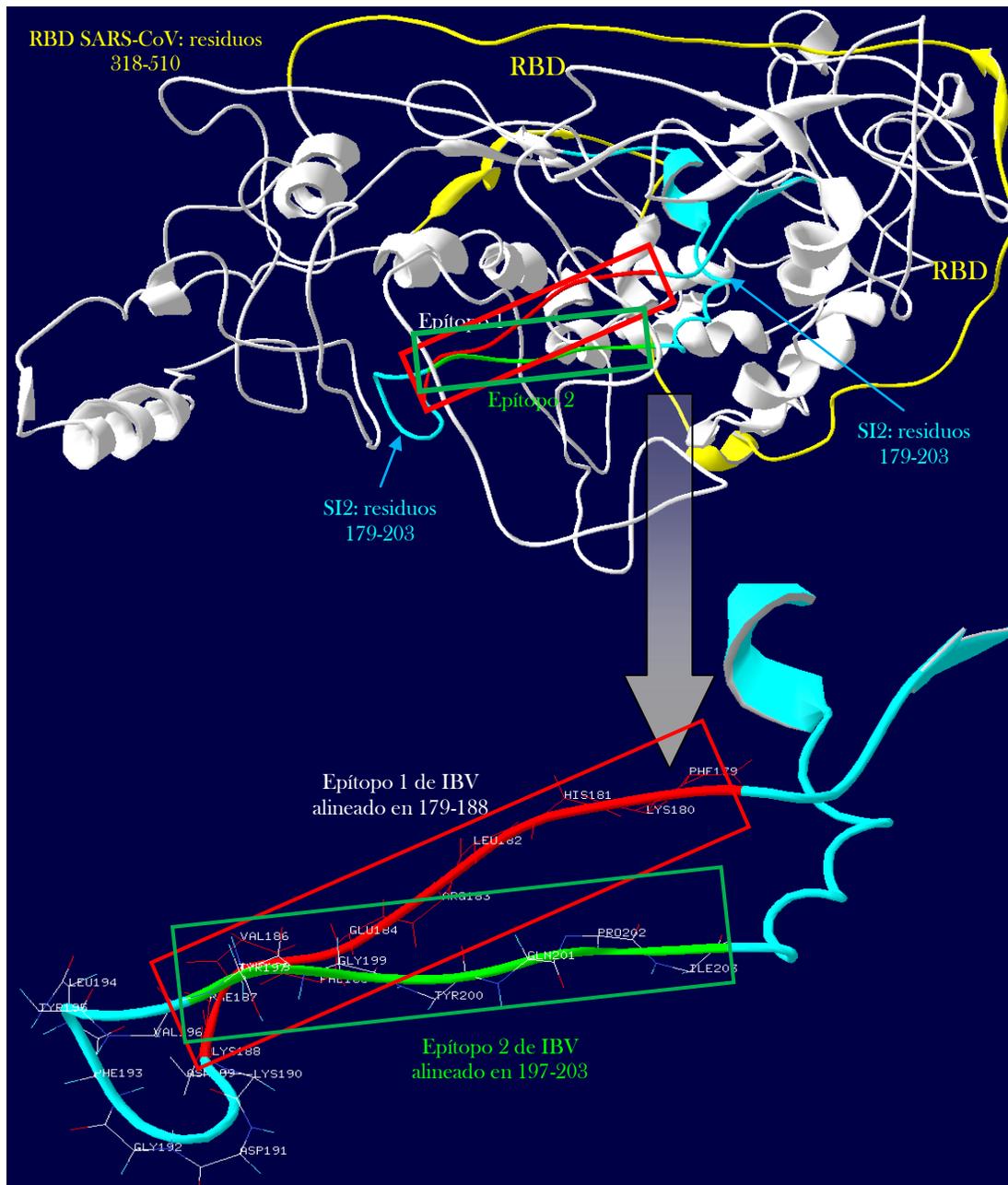


Fig. 29 Predicción de estructura secundaria de SI de IBV en modelo tridimensional de SARS-CoV. Se observa en la parte de arriba a toda la subunidad 1 con su RBD (amarillo) y uno de sus sitios inmunodominantes (SI2). El dominio inmunodominante de IBV (aminoácidos 141-165) se divide en dos epítomos que se alinean con los sitios 179-188 en rojo (epítomo 1) y 197-203 en verde (epítomo 2) del virus SARS-CoV. Ambas estructuras presentan forma de espiral al azar (random coil) unidos por un puente en forma de giro b (β -turn).

VII.2.3 Comparación del dominio de unión al receptor de SARS-CoV y la secuencia de carboxilo terminal de S1 de IBV

Los epítomos encontrados en IBV por *phage display* no alinearon con el sitio inmunodominante principal de SARS-CoV, el sitio de unión al receptor (RBD, aminoácidos 318-510). Se realizó un análisis comparativo (Fig. 30) entre el dominio de unión de SARS-CoV y su sitio respectivo en variantes de IBV (no se utilizó la secuencia de S1 de UNAM 2001 porque solo presenta los primeros 224 aminoácidos secuenciados). Este alineamiento demostró que se tuvo un 47% de similitud entre ambas secuencias y un 11% de homología. Se encontró que uno de los epítomos descubiertos por Ignjatovich y Sapats, 2005 (288-306 en este alineamiento y 294-316 por tales autores) el cual, permite la protección cruzada entre cepas australianas, se traslapó con N-ter RBD de SARS-CoV.

En este epítomo de IBV, los aminoácidos Gly293 y Thr304 se mantienen en la secuencia de SARS-CoV (391 y 402), además de haber otros aminoácidos de polaridad similar (Asn/Asp/Gln295 de IBV con Asp393 de SARS-CoV y Lys/Gln303 del virus aviar con Gln401 del virus humano). También se demostró que ambas secuencias comparten dos cisteínas. Las Cys 467 y 474 de SARS-CoV se alinean con las Cys 365 y 376 de S1 de IBV. También se encontró que los aminoácidos Ser380 y Lys389 de IBV se alinearon con Asn479 y Thr487, respectivamente, dos aminoácidos críticos para la unión específica al receptor celular humano. Al mismo tiempo, este alineamiento demostró que el aminoácido Val491 de IBV se sustituye por Thr489 en SARS-CoV, mientras que la Tyr392 de IBV se conserva en la posición 491 del virus SARS. Estos dos aminoácidos son usados por el virus humano para la unión a un anticuerpo monoclonal (m396).

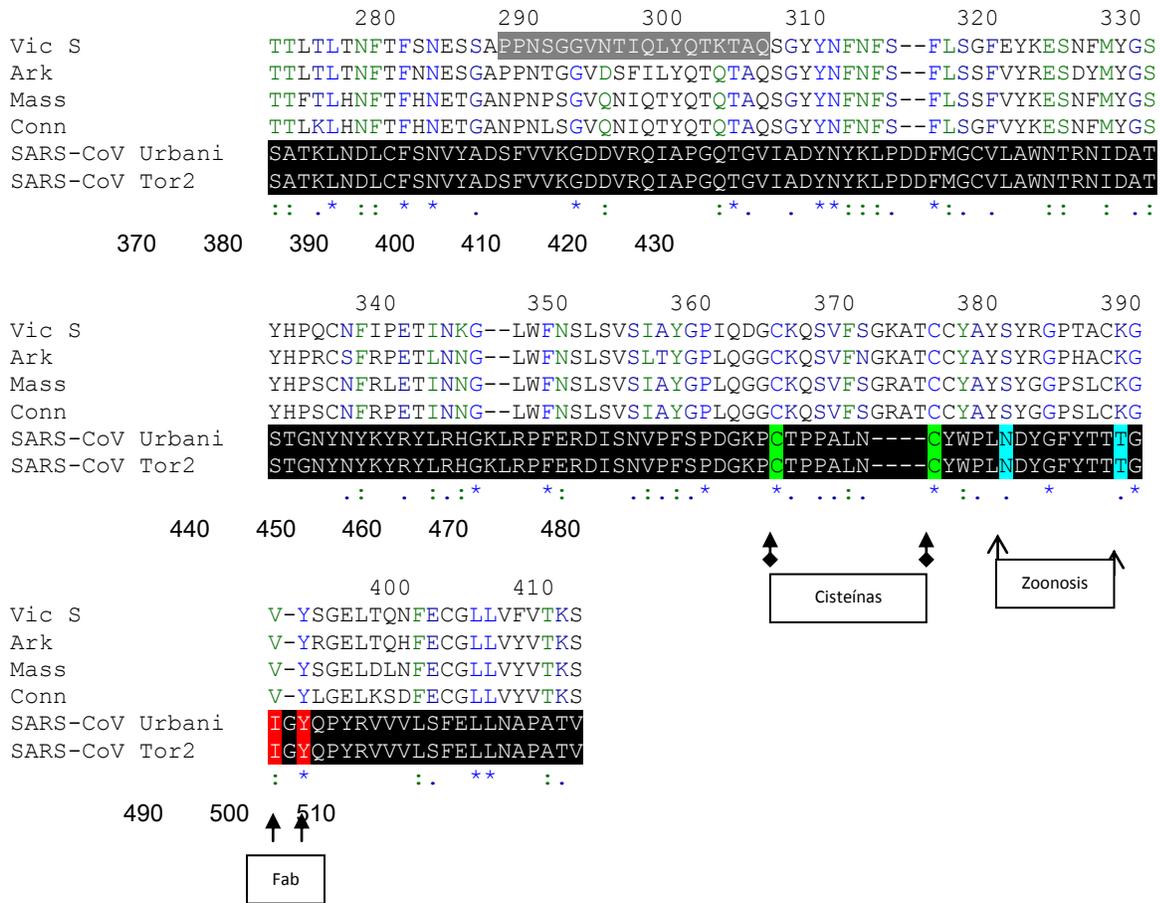


Fig. 30 Alineamiento de RBD parcial (aa 370-510, en fondo negro) de SARS-CoV con S1 de IBV (272-411). En fondo gris se encuentra uno de los epítomos descubiertos por Ignjatovich and Sapats, 2005 que promueve la reactividad cruzada entre variantes australianas. Este epítomo de IBV se empalma con la región 386-404 de SARS-CoV. Se marcan las cisteínas 467 y 474; los aminoácidos críticos (Asn479 y Thr487) para zoonosis (estudio de alineamientos entre virus humano y del mamífero civeta); y los aminoácidos necesarios para la unión a Fab (Ile489 y Tyr491).

Para comparar las secuencias del posible sitio de unión al receptor de S1 de IBV, se realizó un alineamiento múltiple con secuencias parciales de S1 de distintos coronavirus (Fig. 31). En este alineamiento de secuencias de coronavirus se observó que la mayoría de las secuencias de RBD de los coronavirus de diferentes grupos se encontró en la parte C-terminal de S1.

MHV (AAW47240)	DCKIEDWLAAKTVSSPLNWERKTFQNCNFNLSLLRVVQAESLSCINIDA	377
TGEV (ABC72414)	EMPFGVTDGPRYCV---LYNGTALKYLGTLPPIVKEIAISKWGHFYING	434
PEDV (ABJ51939)	AIPLGATQVPYYCFKLVDTYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGDVYVNG	407
HCoV 229E (ABB90517)	HIPSGTVLGNFYCFVNTTIGNETTSAFVGFALPKTVREFVISRTGHFYING	105
IBV Mass (AAS67646)	AMK NGQLFYN ----- LTVSVAKYPTFKSF QCVNNTLSVYVNG	177
SARS CoV (AAP13441)	NFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCS	279
MHV (AAW47240)	VKVYGMCFGSISIDKFAIP---NSRRVDLQLGNSGFLQSFNYKIDTRATS	424
FIPV (P10033)	YNFFSTFPICISFNLT---TGVSGAFWTIAYTSYTEALVQVENTAIKN	483
TGEV (ABC72414)	YNFFSTFPIDCISFNLT---TGDSDFWFTIAYTSYTEALVQVENTAIK	480
PEDV (ABJ51939)	FGYLHLGLLDAVTFINFTGHGTDDVDSGFWTIASNFVDALIEVQGTAIQR	457
HCoV 229E (ABB90517)	YRYFTLGNVEAVNFVNT---NAET-TVCTVALASYADVLVNVVQTAIAN	250
IBV Mass (AAS67646)	DLVYTSNETTDVTSAGVY---FKAGGPITYKVMREVKALAYFNVTNGTAQD	224
SARS CoV (AAP13441)	QNPLAELKCSVKSEIDKG---IYQTSNFRVVPVSGDVVRF PNITNLCPFG	326
MHV (AAW47240)	CQLYLSLAQNNVTVTNHNPSSWNRRYGFNDVATFGSGKHDVAYAEACFTV	474
FIPV (P10033)	VTYCN-SHINNIKCSQLTANLNGFY PVAS --SEVGFVNKSVVLLPSFTT	530
TGEV (ABC72414)	VTYCN-SVYNNIKCSQLTANLNGFY PVSS --SEVGLVNKSVVLLPSFTT	528
PEDV (ABJ51939)	ILYCD-DPVSQLKCSQVAFDLDDGFY PISSRNLLSHEQPI SFVTLPSFND	506
HCoV 229E (ABB90517)	IIYCN-SVINRLRCDQLSFDVDPDGFY STSP --IQSVELPVSIVSLPVYHK	297
IBV Mass (AAS67646)	VILCDGSPRGLLACQYNTGNFSDGFY PFIN ---SSLVKQKFIIVYRENSV	270
SARS CoV (AAP13441)	EVFNATKFP SVYAWERKK ISNCVADY SVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN D	376
MHV (AAW47240)	GASYCPCANPSIVS---PCTTGKPKFANCFIGTVNRECNVPLPLGSLNFKC	521
FIPV (P10033)	YTAVNITIDLGMKI -SGYGQPIASTLSNI TLPMQDNNTDVYCI RSNQ F SV	579
TGEV (ABC72414)	HTIIVNITIGLGMKR -SGYGQPIASTLSNI TLPMQDNNTDVYCI RS DQ FSV	577
PEDV (ABJ51939)	H SFVNITVSAS FGG ----- H SGANLIASDTTINGFSS FCV DTR QFTI	548
HCoV 229E (ABB90517)	HTFIVLYVNFKLRSGVGRRCNCRPAVVNI TLANFN ETK GPLC VDTS SHFT	347
IBV Mass (AAS67646)	NTTFTLHN-FT FH NETGANPNPSGVQNI QTYQTQ TAQSGY Y N F NFS L SS	319
SARS CoV (AAP13441)	LCFS NVYAD SFVVK ----- G DDV RQI AP GQ TGVIADY NYKL PDD F MG C	419
MHV (AAW47240)	DCTCNPS-----PLTTYDLRCLQARSMLGVGDH	549
FIPV (P10033)	YVHSTCKSLWDNIFNQDCTDVLEATAV IKTG TC PF S FDK LNNY L T FN KE	629
TGEV (ABC72414)	YVHSTCKSLWDNVF KRN CTDVLEATAV IKTG TC PF S FDK LNNY L T FN KE	627
PEDV (ABJ51939)	SLF YNVTNSY G ----- Y VSK SQ DS N CF FTL Q S VNDY L S F SK F	585
HCoV 229E (ABB90517)	QFVG-AKFDRWS-----ASINTG NC PF S FG KV NN F V K FG S V	382
IBV Mass (AAS67646)	FVYKES N MY S ----- Y H P SC N FR LE T IN GL W F N SL	352
SARS CoV (AAP13441)	V LAW N TR N ID A T S ----- T G N Y N Y K Y R Y L R H G L R P F E R D	454
MHV (AAW47240)	CEGLG--VLEDKCGGHNTCN-----CSADAFVGVAKDSCLSNGRCRIFG	591
FIPV (P10033)	CL SL S -- P VGAN C K F D V AAR----- TR - T NE Q V R S L Y V I Y EE	664
TGEV (ABC72414)	CL SL S -- P VGAN C K F D V AAR----- TR - T ND Q V R S L Y V I Y EE	662
PEDV (ABJ51939)	CV ST S -- L LA S A C T I D L FG Y ----- P E F G S G V K F T S L Y F Q FT K	621
HCoV 229E (ABB90517)	CF SL K -- D IP G G C AMP I MAN----- L AN L NS H T I G S L V Y S W S D	418
IBV Mass (AAS67646)	SV S I AY G PL Q GG C K Q S V F S GR A T C C Y A S Y G GP S L C K G V S G E L D L N F E C	400
SARS CoV (AAP13441)	I SN V FP S PD G K P C T PP A L N C Y W P LN----- D Y G F Y T T T G I G Y Q P R V V L S	500
MHV (AAW47240)	NLMNLNGINSG-----TTCSTDLQLSNTEVVVTGICVKYDLYGITGQGVF	634
FIPV (P10033)	GD N I V G V P S----- D NS L GL H DL S V L H L DS C T D Y N I Y GR T G V G I	702
TGEV (ABC72414)	GD N I V G V P S----- D NS L GL H DL S V L H L DS C T D Y N I Y GR T G V G I	700
PEDV (ABJ51939)	G EL I T G T P K----- P LE G V T D V S F M T L D V C T K Y T I Y G F K G E G I	660
HCoV 229E (ABB90517)	GD V I T G V P K----- P VE G V S S F M N V T L N C T K Y T I Y D V S G V G V I	457
IBV Mass (AAS67646)	G LL V Y V T K S G S R I Q T A T E P P V I TR H N Y N N I T L N T C V D Y N I Y GR T G Q G F I	450
SARS CoV (AAP13441)	F EL N A P A T ----- V CG P KL S T D L I K N Q C V N F N I G L T G T G V L	538

Fig. 31 Alineamiento múltiple entre la subunidad 1 de diferentes coronavirus. En gris se muestran los epítomos encontrados experimentalmente en diferentes coronavirus (en negro, clúster de epítomos de IBV encontrado con nuestros experimentos). Se observa que la mayoría de estos sitios se encuentra en la parte C-terminal de dicha subunidad. MHV (virus de hepatitis murina), FIPV (virus de la peritonitis felina), TGEV (virus de la gastroenteritis transmisible porcina), PEDV (virus de la diarrea epidémica porcina), HCoV-229E (coronavirus humano), IBV Mass (virus de la bronquitis infecciosa serotipo Massachusetts), SARS-CoV (virus del síndrome respiratorio agudo severo).

DISCUSIÓN

Los resultados anteriores demuestran la antigenicidad y la inmunogenicidad de algunos epítomos (o un clúster inmunogénico) encontrados en la subunidad 1 (S1) de la glicoproteína *Spike* cerca de una región altamente variable del virus de bronquitis infecciosa. También se evidencia el éxito, como herramienta inmunológica, de la técnica de *phage display* para la localización de estos aminoácidos críticos que intervienen en la unión antígeno-anticuerpo, así como su relevancia en la producción de inmunógenos para la neutralización viral. Asimismo, algunos programas bioinformáticos permitieron apreciar las diferencias y similitudes de secuencias de aminoácidos de los epítomos de esta proteína superficial entre variantes de IBV y el virus SARS.

Es importante hacer notar que el uso de sueros policlonales para la selección de bibliotecas combinatorias (*phage display*) permite la identificación y la determinación estructural de epítomos inmunodominantes a través de mimótopos que presentan residuos que mimetizan a los aminoácidos críticos de estos determinantes antigénicos (Smith and Petrenko, 1997; Palacios-Rodríguez Y *et al*, 2007; Gazarian *et al*, 2001) Usualmente uno de los epítomos en el agente patógeno es inmunodominante cuyo anticuerpo domina en el suero. Esto es importante porque en el *biopanning*, los péptidos seleccionados por este anticuerpo también dominarán en las diferentes rondas. Incluso se ha pensado que estos mimótopos podrían ser candidatos ideales para el desarrollo de vacunas (Folgori *et al*, 1994). *Phage display* ha tenido buenos resultados para la localización de epítomos inmunodominantes de virus a base de ARN en donde se ha reportado que los mimótopos han sido excelentes inductores de anticuerpos (Palacios-Rodríguez *et al*, 2007; Roccasecca *et al*, 2001). Palacios-Rodríguez *et al*, 2007 crearon mimótopos para el epítomo más inmunodominante de gp41 de HIV-1, CSGKLIC, obteniendo así una población de péptidos mimetizantes con la secuencia CxxKxxC o también, el grupo de Humbert en el 2007, realizaron estudios en pacientes no progresivos en estado terminal, de los cuales, los anticuerpos neutralizantes sirvieron para seleccionar mimótopos de epítomos de la gp120. Se han producido péptidos miméticos de epítomos de proteínas de envoltura de virus humanos como el virus Epstein-Barr (Casey *et al*, 2006), virus de la encefalitis japonesa (Lin and Wu, 2004), virus de la hepatitis C (Spiga *et al*, 2007, Jolivet-Reynaud *et al*, 2004, Petit *et al*, 2003) y A (Larralde *et al*, 2007) y virus sincitial respiratorio (Steward MW, 2001). Para el caso de los virus de interés veterinario, son pocos estudios los que se han realizado: epítomos de herpesvirus bovina I (Lehmann *et al*, 2004), del coronavirus de la gastroenteritis transmisible porcina y, dentro del ámbito avícola, se han creado bibliotecas combinatorias contra el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (Wang *et al*, 2007). Al mismo tiempo, ya se había reportado que la proteína de superficie *Spike* de diversos coronavirus (porcino, felino y murino), contenía determinantes antigénicos (Corapi *et al*, 1995; Sun-Hwa *et al*, 2002;

Tsai *et al*, 2003). En el caso específico de IBV, un coronavirus con una tasa de mutación considerable, se han determinado epítomos en la subunidad 1 (S1) a través de anticuerpos monoclonales (Keeler *et al*, 1998; Moore *et al*, 1997; Kant *et al*, 1992; Ignjatovic and McWaters, 1991; Cavanagh *et al*, 1988; Niesters *et al*, 1987; Mockett *et al*, 1984). Sin embargo, a pesar de que se concluyó que *Spike* es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (específicamente en la subunidad 1), no se han logrado identificar aquellos residuos críticos que conforman los epítomos.

Es por ello que en nuestro estudio se utilizó por primera vez la técnica de *phage display* que permite el mapeo de epítomos a nivel de aminoácidos de IBV. Una de nuestras estrategias fue inducir anticuerpos antivirales contra una cepa viral de diseminación mundial y contra una local que sirvieron para seleccionar mimótopos en el *biopanning* con fagos M13. Los antisueros anti-UNAM y anti-Mass fueron evaluados en ELISA en donde resultaron tener reactividad cruzada con los virus. El virus UNAM 2001 fue reconocido por los anticuerpos de ambos en una titulación mayor que con el virus Mass. Esto puede deberse a que el virus UNAM 2001 presente sus epítomos más expuestos en la superficie, lo cual permitió un mejor reconocimiento por parte de ambos anticuerpos. Para poder realizar la selección de mimótopos, primero se purificaron las inmunoglobulinas de los sueros de los animales. La inmunoglobulina Y aviar de suero anti-Mass, presentó reactividad cruzada con otros virus (con una mayor concentración de la proteína se tuvieron valores de absorbancia mayores que con el suero), aunque tuvo una mejor afinidad con otros IBV como UNAM 2001 y Conn, y con relación a la anterior prueba de ELISA con antisuero, esto pudo deberse a que estos virus presentaron un mayor número de epítomos que Mass y, por lo tanto, pudieron interactuar con más sitios de unión múltiple de la IgY anti-Mass. Los sueros antivirales de conejo resultaron ser hiperinmunes al presentar absorbancias arriba de 1.5 en ELISA. La IgG también presentó reactividad cruzada, lo que demuestra que UNAM 2001 también es una cepa heteróloga como Mass lo que puede significar que ambos comparten epítomos. Los antisueros y la IgG de conejo inoculado con péptido 138 (parte carboxilo terminal de HVR) resultaron ser hiperinmunes también. Lo interesante de la ELISA con IgG anti-P138, es el hecho de que el antisuero solo tuvo reactividad con el péptido libre y no con los virus (y viceversa, los antivirales no tuvieron reactividad contra el P138), lo que indicó que este epítomo en realidad no es lineal y esto se confirma en otra ELISA con sueros aviares antivirales donde éstos reaccionaron con P138 acoplado a BSA y no al péptido libre (lineal). Esto podría suponer que el BSA, por cuestiones de fuerzas intermoleculares entre aminoácidos, le propició cierta conformación al péptido libre. De estos últimos resultados se concluye que a) la respuesta humoral de conejos y aves (hospedero original del virus) es diferente por presentar estructuras diferentes entre sus inmunoglobulinas (IgY no presenta región Fc) y b) el epítomo de P138 presenta conformación y está expuesto en la superficie de la proteína nativa de ambos virus.

En el *biopanning*, la IgY seleccionó una pequeña población de fagos de 1×10^5 ufp con motivo **QYGKF**. Se le considera una población de fagos significativa cuando presentan alrededor de 1×10^9 ufp (Gazarian et al, 2001). En ELISA, los valores de absorbancia de IgY con las clonas con motivo 3, 7, 8 y 9 fueron menores a 0.15, es decir, hubo una baja afinidad con respecto a la biblioteca combinatoria (es la primera vez que se realiza biopanning utilizando anticuerpos de ave, lo cual, no es muy claro el papel de la IgY para la selección de mimótopos). Es por ello que en el estudio también se utilizó la inmunoglobulina G de conejos inoculados con Mass y UNAM 2001 (con altos títulos de antisuero policlonal) para el *biopanning*. La población de clonas seleccionadas por IgG fue de 1×10^9 ufp y presentó el motivo **YPxYxxL**. Los motivos de ambas poblaciones de fagos (seleccionados por IgY e IgG) resultaron traslaparse en el epítipo 159-**YPSFRSL**-165 de S1 de UNAM 2001 (152-**YPTFKSF**-158 en Mass). Se demostró que el motivo **QYGKF** (representado hasta en un 22% en la población de fagos), presentó a Tyr y Phe en su secuencia, las cuales se alinean con la Tyr159 y Phe162 de UNAM 2001. El motivo **YPxYxxL** (33% en la población de clonas) estuvo mejor representado en este epítipo ya que dos Tyr, Pro y Leu se alineaban con la Tyr159, Pro160, Tyr162 y Leu165 con tres aminoácidos variables (x) intercalados en el motivo. Este epítipo de UNAM 2001 se encontró cercano (10 aminoácidos los separan) a carboxilo terminal de la región altamente variable de S1 (HVR). Esta zona se ha caracterizado por presentar mutaciones que permiten la emergencia, proliferación y evolución de serotipos nuevos de IBV (Cavanagh *et al*, 1988; Wang *et al*, 1994; Schikora *et al*, 2003 y Landman *et al*, 2006). De nuestras clonas seleccionadas por IgY e IgG no se determinaron epítipos dentro de C-ter de HVR en donde previamente, con anticuerpos monoclonales, se habían determinado sitios antigénicos (Moore *et al*, 1997; Kant *et al*, 1992). Es por ello que se decidió utilizar también péptidos sintéticos derivados del alineamiento de secuencias conservadas de variantes de IBV de California (filogenéticamente cercana a UNAM 2001, la cual, hasta la fecha, no presenta variantes) que cubrían la parte C-ter de HVR. El péptido 138 (138-MKSNGTGPSDLFYNLTV-154 de la secuencia de S1 de CA 88) resultó ser inmunogénico. Su anticuerpo seleccionó mimótopos (motivo **QxTGPLxF** representado en un 34% de las clonas) del epítipo 141-**NGTGPSDLFY**-150 de IBV CA 88 (alineado con 141-**GGDPSDLFY**-150 de la secuencia S1 de UNAM 2001) que se encontró exactamente en el amino terminal de HVR. Se observó que los aminoácidos Gln (100% de presencia en la población de clonas), Thr (35%), Gly (15%), Pro (75%), Leu (100%) y Phe/Ala (50%) se alinearon con Asn141, Thr143, Gly144, Pro145, Leu148 y Tyr150, respectivamente de la secuencia de CA 88. Los aminoácidos Ser146 y Asp147 no estuvieron representados en los mimótopos, lo que se podría suponer que ambos están ocultos en el epítipo formando una pequeña asa ocasionado por la presencia de Pro. Por lo tanto, este epítipo tiene cierta conformación (semi-conformación) al presentar tanto aminoácidos adyacentes como también aminoácidos no arreglados secuencialmente.

Los mimótopos de epítomos cercanos a HVR obtenidos gracias al uso de anticuerpos virales y de péptido no tan solo son antigénicos, sino que también inmunogénicos al despertar una respuesta inmune en ratones y en aves (el mismo fago actúa como adyuvante). Los anticuerpos murinos anti-clonas 21 y 19 con motivo tuvieron reactividad con el virus UNAM 2001 en ELISA, lo que indicó que los aminoácidos de las clonas con motivo QxTGPLx F se conservan en el epítomo viral manteniendo una estructura fisicoquímica similar. La inmunogenicidad de los mimótopos es crucial cuando en pruebas de ELISA pueden tener reactividad cruzada contra el virus en cuestión porque demuestra que los péptidos expresados en el fago en realidad están mimetizando inmunológicamente a los epítomos del virus infeccioso como sucedió en el grupo de Steward (1995) que obtuvieron mimótopos de una biblioteca combinatoria de ocho residuos seleccionados con un anticuerpo monoclonal anti-proteína de fusión del virus del sarampión (MV). En este mismo trabajo uno de los sueros murinos anti-mimótopo tuvo reacción cruzada contra MV en una prueba de ELISA con un título de 1:80. Además, ya se han obtenido previamente mimótopos inmunogénicos de regiones altamente variables en el virus de la hepatitis C (Roccasceca *et al*, 2001). Estos péptidos miméticos presentaron reactividad cruzada con el virus en inmunoensayos.

Los fagos con mimótopos obtenidos con inmunoglobulinas de aves y conejos fueron inoculados a aves en un ensayo de protección. En el primer estudio de estos mimótopos en ELISA (antes del desafío con UNAM 2001), se observó que los antisueros de la clona 2 y el grupo de clonas 2, 6, 8 y 10 seleccionadas con IgG de conejo presentaron reactividad con el virus UNAM 2001 (los valores de absorbancia contra sus propios antígenos, las clonas, fueron más altos debido a que los anticuerpos pudieron reconocer a las proteínas del fago), lo que indicó que los epítomos de IBV están representados en los mimótopos de las clonas y son inmunogénicos. En el ensayo de protección donde se infectaron las aves con UNAM 2001 una vez inmunizadas con la vacuna comercial y las clonas, los mimótopos con ambos motivos ya sea en su presentación en eluido total o clonas individuales pudieron neutralizar al virus. Principalmente las clonas 2, 6, 8 y 10 (motivo YPxYxxL) y la clona 3 (motivo QYGKF) evitaron las alteraciones órgano-patológicas (neumonía intersticial, nefritis, hiperplasia peribronquial) en las aves en un 75% (Tabla 3 y Fig. 25). La vacuna comercial indujo una respuesta inmunológica, pero no protectora. Según estudios con los serotipos mundiales utilizados en programas de vacunación, la protección cruzada de los mismos es muy pobre o moderada en el caso de las cepas pneumotrópicas (Rosenberger *et al*, 1976; Hofstad, 1981) y pobre en el caso de las cepas vacunales nefrotrópicas (Pensaert & Lambrechts, 1994; Cook *et al*, 2001). En estudios anteriores ya se tenía conocimiento de estudios de neutralización viral y ensayos de protección en aves. Nix *et al*, 2000; Cavanagh *et al*, 1997; Cook *et al*, 1999 y Parsons *et al*, 1992 mencionan que existe una heterogeneidad de la respuesta inmune en aves frente a una inoculación con cepas homólogas. Ignjatovic y Sapats en 2005, a través del uso de péptidos sintéticos (del aminoácido 194 a C-ter), caracterizaron epítomos en S1, de los cuales dos de ellos protegían a las aves de nefritis. En este

mismo sitio, en lo que sería después de HVR-2, se encontró que la zona que abarca del aminoácido 274-387 actuaba como un sitio antigénico (Koch *et al*, 1991 y confirmado por Moore *et al*, 1997) y esto es posiblemente a la poca variación que presenta S1 entre variantes en la parte C-ter.

Los resultados anteriores (estructura conformacional e inmunogenicidad de mimótopos de epítomos de IBV) se complementan con los obtenidos por Niesters y cols. (1986); Kusters (1989) y Kant y cols. (1992). Estos grupos de investigadores pudieron localizar epítomos conformacionales en la zona altamente variable (HVR) a través de la selección de aislados resistentes a anticuerpos monoclonales. De este trabajo, dos variantes de IBV (cepa D207) presentaron mutaciones en los aminoácidos 132 (H→Y) y 149 (L→S), los cuales delimitan al sitio antigénico E, residuos 132-149, en donde se encontró nuestro epítomo 1 (Fig. 26). Este clúster de epítomos se suma a los otros sitios antigénicos descubiertos en S1 de IBV D207: sitio antigénico A, residuos 24-60; E, residuos 132-149 (en donde se traslapa el epítomo 1) y C/A/B, residuos 291-398. Es importante hacer notar que desde ese año no se habían determinado con exactitud los aminoácidos involucrados en la estructura de un epítomo inmunodominante de *Spike*. Es muy difícil mapear epítomos de proteínas de envoltura de virus de ARN con anticuerpos neutralizantes debido a estas zonas variables. *Phage display* permite generar grandes bibliotecas de variantes que pueden mimetizar este tipo de sitios variables de la proteína e inclusive reproducir en el laboratorio toda la magnitud del proceso evolutivo del virus y la selección de variantes derivadas (Smith, 2001). Por lo tanto, nuestros resultados demostraron que los motivos QxTGPLxP, QYGKF y YPxYxxL están mimetizando a un posible clúster conformacional de dos epítomos, el cual es inmunodominante. El primer epítomo (1) que se encontró en amino terminal de HVR fue 141-GGDSPSDLFY-150 de UNAM 2001 seguido de ocho aminoácidos que no fueron reconocidos (como una “bisagra” que podría servir de soporte para unir a estos dos epítomos) y por último, el epítomo 2 con la secuencia 159-YPSFRSL-165 (Fig. 26). Cabe aclarar que los epítomos no necesariamente deben conservarse en los mimótopos ya que existen algunos aminoácidos que son fisicoquímicamente parecidos y que es suficiente para mimetizar conformacionalmente a los epítomos (Geysen *et al*, 1986).

Al realizar un alineamiento de las secuencias de aislados internacionales y locales distribuidos en México, reveló que este clúster de epítomos se conservaba en muchos virus (Fig. 26) lo que significaría que los anticuerpos neutralizantes para cada uno de los virus podría tener una reacción cruzada con el epítomo homólogo de otro virus. En el alineamiento de la Fig. 26 se aprecia que las secuencias de las cepas Mass y Com, de distribución mundial, presentan espacios (*gaps*) que se alinean con nuestro epítomo 1, es decir, probablemente en la evolución del virus, se deletaron los residuos más críticos del epítomo. En el coronavirus murino, esta delección se encontró también en N-terminal de S1 en diferentes variantes resistentes a anticuerpos monoclonales. Es por ello, que nosotros pensamos que esta delección posiblemente se debió a que tales virus tuvieron que eliminar este epítomo por su reconocimiento hacia el

anticuerpo aviar y, por lo tanto, escapar de su neutralización. Asimismo se han reportado estudios de patógenos que evaden la respuesta inmune del hospedero mutando zonas antigénicas de proteínas de superficie (Deitsch *et al*, 1997; Brown *et al*, 2003). Esto es de considerarse ya que, como vimos, en el caso de IBV, las cepas Mass y Conn son utilizadas a nivel mundial como vacunas vivas e inactivadas y se ha visto que sus antisueros no pueden tener reactividad cruzada con las cepas locales como las mexicanas (Cavanagh, 2005), incluso, se podría mencionar que, UNAM 2001, BL 56 y UNAM 97, en un futuro, desplazaría a Mass por afinidad celular, es decir, las aves domésticas en México serán más susceptibles de enfermarse por las cepas virales mexicanas que por Mass y Conn. La solución podría ser el uso de colecciones de mimótopos inmunogénicos que presentan reactividad cruzada con los epítomos de cepas locales tomando en cuenta que las secuencias de estas cepas mexicanas se alinean con regiones hipervariables y que podrían permitir la evasión inmunológica en un futuro si utilizáramos vacunas a base de virus vivo.

Integrando todo lo anterior, creemos que los dos epítomos encontrados por *phage display*, en realidad forman un clúster inmunogénico que abarca del aminoácido 141 al 165 en la secuencia de UNAM 2001. Sin embargo, en ningún estudio de epítomos inmunodominantes de IBV se ha reportado su estructura debido a que aún no existe el cristal de la proteína *Spike* de IBV. La estructura secundaria permitiría determinar la forma en que el epítomo podría unirse molecularmente a su anticuerpo para el desarrollo de vacunas anti-IBV. Tampoco se ha reportado la estructura tridimensional de esta proteína en otros coronavirus animales. Se tiene solo caracterizado estructuralmente el dominio S2 tanto para el virus de hepatitis murina (*Protein Data Bank* (PDB): 1WDF y 1WDG, Xu *et al*, 2004) como para el virus SARS-CoV (PDB: 1ZV7, 1ZB8, 1ZVA en Deng *et al*, 2006). No obstante, la subunidad 1 de la proteína *Spike* del coronavirus humano del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) ha sido modelada tridimensionalmente (número de acceso en *SwissProt*: P59594) por el grupo de Spiga *et al*, 2003, además de saber que también es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (He *et al*, 2004; Li *et al*, 2003). Este mismo grupo se basó en la homología de la subunidad con respecto a la secuencia de la neurotoxina B (estructura ya cristalizada) de *Clostridium botulinum*. De acuerdo a este modelo, S1 presenta dos áreas estructuralmente distintas. Una de ellas es rica en α -hélices, la cual forma un núcleo compacto hidrofóbico, típico de las proteínas globulares, mientras que la otra parte es totalmente hidrofílica, en su mayoría lineal conteniendo al dominio de unión al receptor (RBD) inmunogénico. Esta es la razón por la cual se decidió utilizar este modelo para poder determinar, mediante homología de secuencias, la estructura que tiene nuestro clúster inmunogénico de IBV. Al hacer un análisis comparativo entre las secuencias de aminoácidos de la subunidad 1 se observó que nuestro clúster inmunogénico (aa 141-165 de la secuencia de UNAM 2001), se traslapaba con los residuos 179-203, los cuales se encuentran en la parte media del sitio inmunodominante II (SI2, aa 171-224) de SARS-CoV. Este es uno de cuatro

sitios inmunodominantes caracterizados por PEPSCAN (He *et al*, 2004). S12 resultó ser reactiva hasta más de un 50% con el suero de pacientes con SARS. Leu148, Phe149 y Asn151 del epítipo 1 de IBV, se traslaparon con sus homólogos polares Val186, Phe187 y Asn189 de S1 de SARS-CoV (similitud del 30%), mientras que en el epítipo 2, los residuos Tyr159, Phe162, Arg163, Ser164, Leu165 de IBV se alinearon con Tyr197, Tyr200, Gln201, Pro202 e Ile203 de S1 de SARS-CoV (similitud del 70%). Dentro del dominio señalado en SARS-CoV, donde coincide con nuestro clúster, presenta una forma de asa que causa que los dos epítipos lineales se sitúen uno frente al otro (Fig. 29). La curvatura del clúster (β -turn), según este modelo, es ocasionada probablemente por los aminoácidos que no fueron seleccionados por los anticuerpos en nuestro estudio experimental. En dicha secuencia de aminoácidos (CA 88 y UNAM 2001) existe una prolina en la parte media de esta asa no antigénica, la cual podría producir dicha curvatura. Es interesante también señalar que en la mayoría de los trabajos con IBV, ya se ha descrito una topología conformacional de los epítipos de *Spike* (Wang *et al*, 1995; Parr and Collison, 1993; Karaca *et al*, 1992; Lenstra *et al*, 1990; Niesters *et al*, 1987). Sin embargo, Ignjatovic y Sapats (2005) utilizaron péptidos sintéticos de S1 y S2 de IBV que resultaron tener propiedades antigénicas e inmunogénicas e incluso, protectoras.

Asimismo, el estudio del perfil hidrofílico-antigénico y de predicción de estructura secundaria arrojó resultados que indican que nuestro clúster inmunogénico podría estar expuesto en la superficie de la proteína además de conformarse por estructuras proteínicas del tipo espiral al azar (*coil*).

El dominio de unión al receptor celular (RBD) del virus SARS abarca los residuos 318-510, tiene afinidad por el receptor ACE-2 de células epiteliales humanas y es el más inmunogénico de todos los epítipos encontrados en SARS-CoV (Prabakaran *et al*, 2006; He *et al*, 2005; Li *et al*, 2005; van den Brink *et al*, 2005). En IBV solo se ha reportado que S1 tiene afinidad por el ácido siálico de células epiteliales, pero no se ha identificado la secuencia exacta del RBD. Asimismo, el anticuerpo neutralizante Mab S1b, puede reconocer *in vitro* la región del aa 435-439 de SARS-CoV, la cual forma parte del motivo de unión al receptor (RBM, aa 424-494; Li *et al*, 2005), lo que refuerza la idea de que RBD es un sitio altamente inmunodominante. Nuestro clúster de dos epítipos no coincidió en este sitio. Sin embargo, Ignjatovich y Sapats en el 2005 hallaron un epítipo de S1 de IBV de serotipos australianos que abarca del aminoácido 289 al 306 sobreponiéndose a una parte de RBD de SARS-CoV (aa 386-404) muy cerca de RBM (Fig. 30). Gly293 y Thr304 de S1 se conserva no tan solo en algunas variantes de IBV sino también en RBD de SARS-CoV. Estos dos aminoácidos podrían delimitar posiblemente a un epítipo de IBV. Cys467 y Cys474 de RBD de SARS-CoV se alinean con las Cys365 y Cys376 de S1 de IBV, las cuales podrían demostrar que en realidad es un epítipo potencialmente inmunógeno y conformacional. Asn479 y Thr488 son aminoácidos críticos que diferencian el SARS-CoV humano con el de civeta y, por lo tanto, presentan mayor afinidad hacia ACE-2 de las células humanas (Prabakaran *et al*, 2006). Estos aminoácidos se alinean

con los aminoácidos Ser381 y Lys389 de IBV. En nuestro alineamiento también se observó que los residuos polares importantes de RBD para el reconocimiento del parátopo, Ile479 y Tyr491 (Prabakaran *et al*, 2006), se alinean con Val391 y Tyr392, donde la tirosina se conserva en ambos virus.

Conjuntamente, se han hecho estudios de determinantes antigénicos de otros coronavirus. El coronavirus felino presenta un epítopo que se une a su respectivo anticuerpo monoclonal se encuentra entre el aa 509-673 (Corapi *et al*, 1995); el virus de la gastroenteritis transmisible tiene un epítopo entre los aminoácidos 503-715 (Correa *et al*, 1988; Delmas *et al*, 1986; 1990). El virus de la diarrea epidémica porcina presenta un epítopo en el sitio 503-568 (Chang *et al*, 2002), mientras que el coronavirus humano HCoV-229E lo tiene en el sitio 417-546 y en donde también se tiene localizado su probable sitio de unión al receptor (Tsai *et al*, 2003). Al hacer un alineamiento múltiple de estas secuencias con S1 de IBV (Fig. 31), resultó que los epítopos de estos coronavirus se encuentran en C-ter de S1. Este resultado coincide con nuestro alineamiento de la secuencia del epítopo encontrado por Ignjatovich y Sapats y parte de RBD de SARS-CoV anteriormente descrito. Estos datos refuerzan lo encontrado por los grupos de Kant y Kusters (trabajos previamente mencionados en esta discusión) quienes determinaron un sitio antigénico entre los residuos 291 y 398 de la cepa D207 de IBV. También es probable que en esta zona se pueda encontrar el dominio de unión al receptor de IBV entre el aminoácido 250 y 450, pero muy probablemente sin ser inmunodominante (en la estructura 3D de S1 de SARS-CoV tiene un α -hélice que no está expuesta en la superficie) ya que nuestro clúster de epítopos se encontró en la parte amino-terminal de S1 como fue el caso del virus de la hepatitis murina (MHV), cuya subunidad tiene un epítopo o epítopos en los primeros 300 aminoácidos capaces de unirse al receptor celular CEACAM1 (Kubo *et al*, 1994). Además, como se ha discutido anteriormente con los grupos de Kant, Moore y Niesters, los epítopos inmunodominantes residen principalmente en zonas variables de IBV y no en zonas conservadas como lo es N-ter de S2 y la parte C-terminal de S1. Esto podría permitir que el epítopo pueda presentar mutaciones que le ayudan al virus a evadir el sistema inmunológico del hospedero permitiendo la variabilidad antigénica como mecanismo de sobrevivencia del virus.

A manera de conclusión, estos resultados pueden comprobar la efectividad de los fagos con mimótopos como buenos inmunógenos vacunales en el futuro (inclusive, mejor que los péptidos sintéticos) ya que pueden presentarse en forma de epítopos inmunodominantes puros, es decir, no presentan secuencias moduladoras que inhiban la respuesta inmune del hospedero como lo harían las proteínas recombinantes (Solís *et al*, 2005) o los virus (Pudney *et al*, 2005). Al mismo tiempo, estos resultados indican que probablemente si se seleccionan aún más sitios conservados en la parte N-ter de S1 (incluso de S2) de diversas variantes de IBV genótipicamente homólogas o filogenéticamente alejadas, se podrán diseñar vacunas que puedan neutralizar la acción viral con protección cruzada. Los resultados obtenidos experimentalmente a través de *phage display* y las conjeturas hechas por Cavanagh *et al*, 2003 sobre que S1

ya sea expresado en adenovirus como vacuna viva [con una protección hasta de un 90-100% en aves infectadas por IBV (Johnson *et al*, 2003)] o en fragmento puro de la subunidad (Cavanagh *et al*, 1986), podrían extrapolarse al desarrollo de una posible vacuna contra SARS en caso de re-emergencia viral. Con ayuda de *phage display*, se podrían obtener mimótopos de epítomos inmunodominantes de la RBD de S1 de *Spike* del virus SARS para la neutralización viral en hospederos animales y luego, probablemente, en humanos, esto sin la necesidad de hacer vacunas recombinantes que pueden, de alguna forma, promover la inmunomodulación del virus para no ser neutralizado por el sistema inmune del hospedero. Es por ello que sería preferible usar los péptidos miméticos de fagos en vez del epítomo viral ya que presentan una mejor respuesta inmunológica (Zucchelli *et al*, 2001). Esta estrategia permitirá dar pie a la nueva generación de vacunas representadas por inmunógenos miméticos de gran diversidad que serán requeridos para cubrir la diversidad antigénica generada por virus de ARN, principalmente.

CONCLUSIONES

- *Phage display* es una herramienta para la búsqueda de epítomos inmunodominantes de proteínas de envoltura virales a través de la selección de mimótopos.
- Los sueros antivirales resultaron tener reactividad cruzada con UNAM 2001 y Mass, así como con otros virus de bronquitis infecciosa (Conn, UNAM 97, BL 56).
- El P138 (carboxilo terminal de HVR) resultó ser un buen inmunógeno al inducir sueros hiperinmunes en conejos.
- Las inmunoglobulinas antivirales de aves inoculadas con Mass seleccionaron clonas con motivo QYGKF en un 22% de la población, mientras que la IgG de conejo inoculado con UNAM 2001 seleccionó al 33% de la población de clonas que presentaron la secuencia de aminoácidos YPxYxxL. El anticuerpo anti-péptido sintético seleccionó mimótopos que presentaron la secuencia QxTGPLxF en un 34% de la población de fagos.
- Los motivos QYGKF y YPxYxxL de las clonas de fago fueron secuencias traslapadas que mimetizaron al epítomo 159-YPSFRSL-165 o 152-YPTFKSF-158 de S1 del virus UNAM 2001 y Mass, respectivamente. El motivo QxTGPLxF estuvo representado en el epítomo 141-GGDSPSDLFY-150 de UNAM 2001 (en Mass, la mitad del epítomo está deletado).
- Las clonas con motivo QxTGPLxF resultaron ser inmunogénicas al inducir una respuesta inmune en ratones. Asimismo, las clonas con motivo QYGKF o YPxYxxL indujeron una respuesta humoral en aves. Estas tres poblaciones de fago también fueron antigénicas al haber reconocido al virus UNAM 2001 en ELISA.
- Las clonas 2, 6, 8 y 10 combinadas (motivo YPxYxxL) y la clona 3 (motivo QYGKF) neutralizaron de forma parcial (75%) al virus UNAM 2001 en un ensayo de protección a aves. Las aves no presentaron nefropatías o neumopatías a nivel tisular. La vacuna comercial heteróloga solo indujo una respuesta humoral, pero no protectora en aves.
- Los dos epítomos inmunodominantes (141-GGDSPSDLFY-150 y 159-YPSFRSL-165) formaron un clúster que abarca del aminoácido 141 al 165, el cual está unido por un puente de ocho aminoácidos (no reconocidos por los anticuerpos) que funcionan probablemente como soporte al mismo. Este clúster se localizó río abajo de la región hipervariable de S1 de IBV y presentó aminoácidos críticos que se conservaron en diferentes variantes de IBV tanto de cepas de distribución mundial como locales.
- El clúster inmunogénico se alineó con los residuos 179-203 que se localizan en el sitio inmunodominante II (SI2) del virus SARS.

- El estudio del perfil hidrofílico y antigénico, además del análisis de estructura secundaria y uso del modelo tridimensional de S1 de SARS-CoV revelaron que el clúster inmunogénico de S1 de IBV presentó un grado de conformación donde los aminoácidos están expuestos en la superficie de la proteína. Los dos epítomos juntos formaron un asa cuya curvatura es derivada de aquellos aminoácidos que no fueron reconocidos por los anticuerpos.
- Es probable que existan más epítomos en la parte C-terminal de S1, e inclusive, el sitio de unión al receptor de IBV podría encontrarse entre el aminoácido 250 y 450, según alineamientos con RBD de SARS-CoV y otros coronavirus.

PERSPECTIVAS

- La región C-terminal de HVR es un buen candidato para el mapeo de epítomos inmunodominantes. Sería importante generar nuevas bibliotecas de mimótopos de estos probables epítomos en otras cepas virales locales y mundiales.
- No es muy clara la selección de péptidos mimetizantes por inmunoglobulinas de aves en el tamizado (se obtuvo una población de mimótopos baja). Esta es la primera vez que se tiene registro del uso de IgY en *phage display* y por ello sería necesario hacer más pruebas con este anticuerpo en el *biopanning*.
- En el presente trabajo, se utilizó IgY de suero de aves inoculadas con Mass en el *biopanning*. Sería conveniente utilizar también suero anti-UNAM 2001. Asimismo, se hizo tamizado de la biblioteca con IgG de conejos inoculados con UNAM 2001; se tendría que considerar también hacerlo con suero anti-Mass.
- Para una mejor evaluación del ensayo de desafío en aves, sería conveniente que los fagos con mimótopo sean aplicados en una población de aves más grande y que la evaluación del efecto (protección) de éstos sobre las aves se extienda en un tiempo más prolongado. También sería importante realizar reaislados virales post-desafío con RT-PCR para determinar la carga viral en cada órgano blanco. Igualmente, sería útil ver si las clonas seleccionadas protegen a aves de otras cepas virales como Conn, UNAM 97 o BL 56 (protección cruzada).
- Los resultados sugieren que la región C-terminal de S1 se ha caracterizado por presentar el dominio de unión al receptor en otros coronavirus, e incluso, ha resultado ser muy inmunogénico como en el caso de SARS-CoV. Esto podría ser punto de partida para la caracterización de RBD en IBV, el cual podría también presentar epítomos inmunodominantes.
- Sería interesante aplicar la misma metodología para la generación de mimótopos inmunogénicos seleccionados con antisuero de pacientes infectados con SARS-CoV o, en su defecto, sueros policlonales de animales de laboratorio inoculados con virus SARS y/o péptidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia de RBD o de los sitios inmunodominantes como S12.

ANEXOS

ANEXO I

Búsqueda de sitios conservados en la parte N-ter de S1

Para la elaboración de péptidos sintéticos nos basamos en las investigaciones de Schikora y cols. (2005) quienes ya habían estudiado variantes de IBV endémicas de California en las que se estudió su diversidad genética y sus patrones de evolución. En este estudio se mencionó que C-ter de la región hipervariable (HVR), se relacionaba con mutaciones a nivel de aminoácidos lo que promovía la variabilidad genética en estos aislados virales. En el alineamiento con estas variantes, HVR mostró ciertas regiones conservadas, las cuales, fueron utilizadas para el diseño de péptidos sintéticos (Fig. A1a). Otra de las razones por las que se eligió las secuencias S1 de cepas californianas para el consenso y diseño de los péptidos sintéticos es que filogenéticamente son más cercanas a UNAM 2001 (Fig. A1b). Por lo tanto, los sitios conservados que se eligieron fueron ${}_{\text{N-ter } 103}\text{NFTNLVVFVTHCFV}_{116 \text{ C-ter}}$ (denominado péptido 103, P103) y ${}_{\text{N-ter } 138}\text{MKSNGTGPSDLFYNLTV}_{154 \text{ C-ter}}$ (P138) de la cepa original de California, CA 88, que contiene aminoácidos conservados en la mayoría de las demás variantes (Fig. 1a). Las características de los péptidos se presentan en la Tabla A1.

Tabla A1 Características de los péptidos sintéticos de S1 de IBV		
Nombre	P103	P138
Síto	Aminoácidos 103-115	Aminoácidos 138-154
Aminoácidos	NFT NLV VFV THC FK	MKS NGT GPS DLL YNL TV
Número de aa	14	17
Peso molecular	1668 g/mol	1810 g/mol
Pureza	92%	86%

Al mismo tiempo, mediante el programa ANTIGENICITY PLOT se demostró la antigenicidad de uno de los péptidos. El P138 demostró ser potencialmente antigénico al presentar aminoácidos hidrofílicos como lisina, serina, asparagina, glicina y ácido aspártico (Fig. A2). El P103, según el método de predicción de epítomos, no es potencialmente antigénico debido a que el promedio de los valores de antigenicidad están por debajo del límite de los valores de hidrofiliicidad (0 a 3). Esto es debido a que el único aminoácido cargado polarmente en este péptido es la asparagina; sin embargo, consideramos este sitio por ser conservado en HVR.

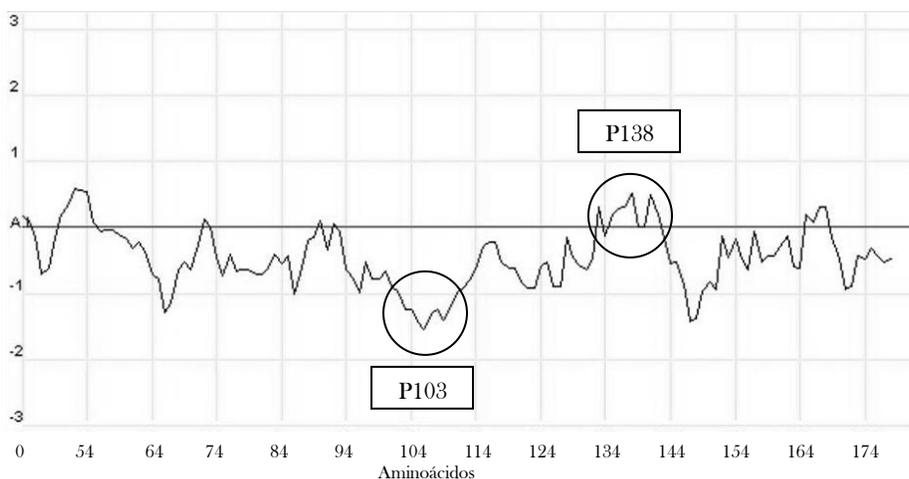


Fig. A2 Perfil antigénico de la secuencia N-ter de S1 de la variante de IBV CA 88. El P103 no es potencialmente antigénico (debajo del eje). El P138 presenta aminoácidos que están dentro de los valores de hidrofiliicidad. El eje de las y representa los valores de hidrofiliicidad (0-3) y el eje de las x contiene aprox. los primeros 180 aminoácidos de Spike.

Alineamiento de la secuencia de los péptidos sintéticos con UNAM 2001 y Mass

Para demostrar que existía una compatibilidad de las secuencias de P103 y P138 con las secuencias de S1 de *Spike* de UNAM 2001 y Mass, se alinearon con el programa ALIGN (Fig. A3). El P103 (aa 103-116) de CA 88 se sobrepone con la misma numeración de secuencia S1 del virus endémico mexicano UNAM 2001 presentando un 90% de similitud con la variante californiana dentro de los primeros 180 aminoácidos (sin considerar la zona de N-ter de espacios o *gaps*). Todos los aminoácidos de esta región se conservan fielmente, excepto por Thr103, Asn104, Leu105 y Val106 que son sustituidos por sus homólogos Ser, Gly, Val y Thr respectivamente del virus mexicano (y Val116 sustituida por Lys116 en UNAM 2001). El P138 presenta aminoácidos conservados (Met, Lys, Gly, Pro, Ser, Asp, Leu, Phe, Tyr, Asn, Leu, Thr y Val) y parecidos fisicoquímicamente (140Ser-Gln, 141Asn-Gly, 144Gly-Ser) con respecto al sitio homólogo de *Spike* de UNAM 2001 (Fig. A3a). El virus Mass presenta un 56% de similitud con respecto a CA 88 dentro de los primeros 180 aminoácidos (sin considerar la zona de N-ter de gaps). El P103 se empalma con el sitio aa103-115 de Mass y en el cual presenta las mismas sustituciones de aminoácidos como en UNAM 2001 en Thr, Asn, Leu y Val. En cambio, en la comparación con el P138 de la variante californiana, existen gaps en Mass en el sitio 143-146 (Fig. A3b)-

Acoplamiento de los péptidos a BSA

Los péptidos sintéticos tienen un peso molecular pequeño para inducir por sí mismos una respuesta inmune (haptenos). Es por ello que éstos se acoplaron vía amino-terminal al acarreador de albúmina sérica de bovino (BSA). En la Fig. A4 se muestra la electroforesis para visualizar el acoplamiento péptido-BSA.

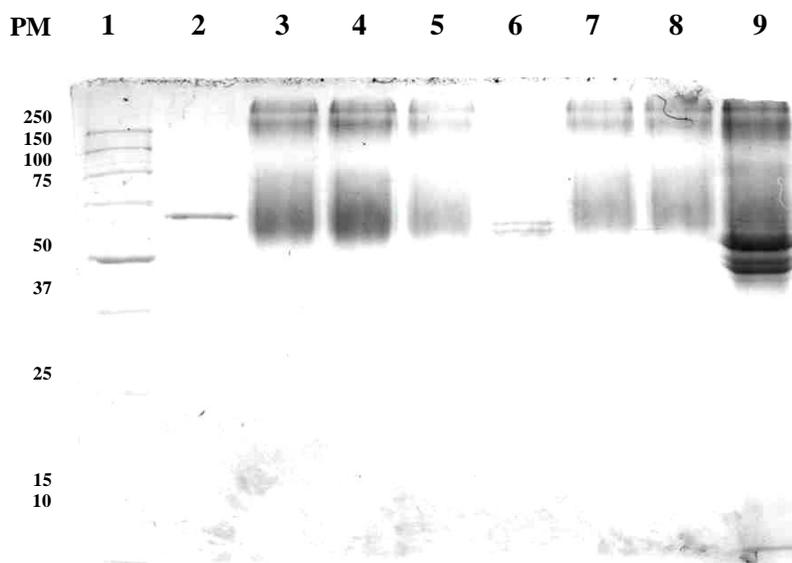


Fig. A4 Electroforesis en gel de acrilamida donde se observa el acoplamiento de ambos péptidos (P103 y P138). Las tres primeras fracciones se obtuvo hasta 1mg/ml del conjugado. 1, marcador de peso molecular; 2, BSA (69 KD); 3, 4, 5 y 6, P103 unido a BSA; 7, 8 y 9, P138 unido a BSA.

ANEXO II

Tabla A2 Características de los aislados de IBV

Cepa	Pase *	Titulación (DIE _{50%}) **	Concentración de proteína (mg/ml)	Volumen obtenido (ml)
Massachusetts	Tercero	10 ^{-5.8}	11	400
UNAM 2001	Onceavo	10 ^{-6.2}	14	600

* Sub-cultivo de virus en embriones de pollo
 ** Recíproco de la dilución del virus por unidad de volumen que resulta de la infección del 50% de los embriones inoculados

Tabla A3 Características de los antígenos y antisueros

Animal de laboratorio	Antígeno	Cantidad de antígeno inoculado	Volumen de anti-suero obtenido (µl)	Título de sus sueros	Concentración del anticuerpo purificado (µg/µl)
Aves	Mass	10 ¹ EID	3,000	1:150	4.084
	UNAM 2001	10 ¹ EID	800	1:150	-
Conejos	Mass	800 µg	60,000	1:10,000	1.460
	UNAM 2001	1000 µg	20,000	1:9,000	2.160
	P103	1000 µg	6,000	-	1.05
	P138	1000 µg	6,000	1:1,200	1.08

Tabla A4 Fracciones de IgY de suero de pollo inmunizado con Mass

Antisuero Mass (# Fracción)	Concentración (µg/µl)	Antisuero Mass (# Fracción)	Concentración (µg/µl)
1	0.189	14	3.612
2	0.341	15	3.000
3	0.243	16	2.162
4	0.285	17	1.343
5	0.240	18	0.932
6	0.882	19	0.383
7	1.466	20	0.095
8	1.564	21	0.113
9	1.681	22	0.061
10	2.326	23	0.052
11	2.625	24	-
12	3.150	25	0.067
13	4.084		

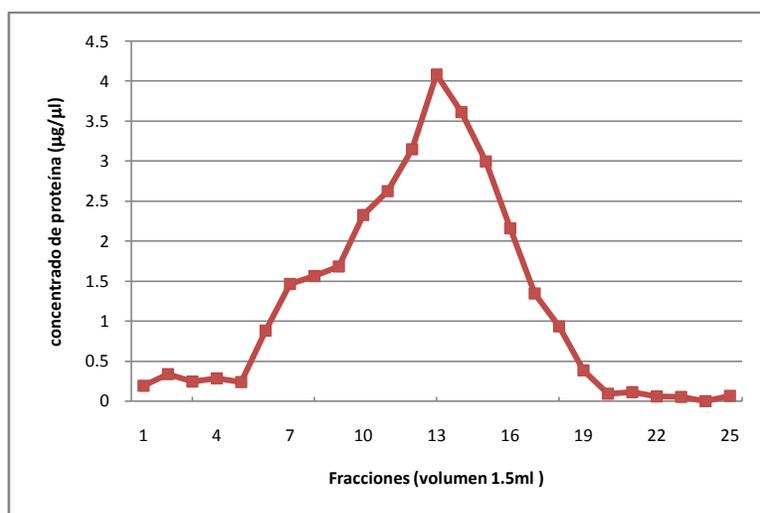


Fig. A5 Concentración de IgY de aves inoculadas con Mass de cada una de las 25 fracciones obtenidas

ANEXO III

Secuencia parcial de S1 de Mass

```

Conf:      76755798987869998889997154988892004344469997777489999948988977
Pred:      CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHCCEEEEECCCCCCCCCCCCCCCC
AA:        SSPGCIVGTIHGGRVNVASSIAMTAPSSGMAWSSSQFCTAHCNFSDDTTFVFTVTHCYKYDGC
           70             80             90             100            110            120

```

```

Conf:      343746588799999938848999998887888843899854885099966487715855
Pred:      CCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCEEEEECCCCCE
AA:        PITGMLQKNFLRVSAMKNGQLFYNLTVSVAKYPTFKSFQCVNNLTSVYLNGLDLYTSNET
           130            140            150            160            170            180

```

Secuencia parcial de S1 de UNAM 2001

```

Conf:      889664599978999986599883678655399998766379999966569988476456
Pred:      EEECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCC
AA:        AGVIYWSKNFSASSVAMTAPGSGMSWSVSQFCTAHCNFSGVTVFVTHCFKKGAGECPLTG
           70             80             90             100            110            120

```

```

Conf:      226897899999868998760699999856788785385220686159986818883275
Pred:      ECCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCEEEEECCCCCEEEEECCCC
AA:        LIPQNYIRISAMKQGGDPSDLFYNLTVPVTKYPSFRSLQCVNNQTSVYLNGLDLYVFTSNE
           130            140            150            160            170            180

```

Fig. A6 Predicción de estructura secundaria del sitio inmunodominante de IBV a través de PsiPred. El programa muestra el nivel de confianza (0-9) para la predicción de la estructura secundaria de la proteína. Se muestra la representación de las hélices (H), hojas β plegadas (E), y espiral al azar (C). AA, secuencia parcial de S1. En sombreado se encuentra el clúster inmunodominante caracterizado por phage display.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adda CG, Anders RF, Tilley L, Foley M, 2002. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Comb Chem High Thr Screen*; 5(1):1-14. Review.
2. Alexander DJ, Allan WH, Biggs PM, Bracewell CD, Darbyshire JH, Dawson PS, Harris AH, Jordan FT, MacPherson I, McFerran JB, Randall CJ, Stuart JC, Swarbrick O and Wilding GP, 1983. A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet Rec*; 113, 64
3. Alvarado IR, Villegas P, Mossos N, Jackwood MW, 2005. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis*; 49(4): 494-9.
4. AVIMEX, 2006. Disponible en: <http://www.avimex.com.mx/index1.htm>. [Acceso: 20 agosto de 2006]
5. Barbas CF 3rd, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones TM, Zebedee SL, Persson MA, Nara PL, Norrby E, et al, 1992. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 89(19):9339-43.
6. Binns MM, Bournsnel ME, Cavanagh D, Pappin DJ, Brown TD, 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J Gen Virol*; 66 (Pt 4):719-26.
7. BIO-ERA, 2007. Available: <http://www.bio-era.net/> [Accessed: February 16 2006]
8. Bishop-Hurley SL, Schmidt FJ, Erwin AL, Smith AL. Peptides selected for binding to a virulent strain of *Haemophilus influenzae* by phage display are bactericidal, 2005. *Antimicrob Agents Chemother*; 49(7):2972-8.
9. Blau DM and Holmes KV, 2001. Human coronavirus HCoV-229E enters susceptible cells via the endocytic pathway. *Adv Exp Med Biol*; 494, 193.
10. Bochkov YA, Tosi G, Massi P, Drygin VV, 2007. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes*; 35(1):65-71.
11. Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA *et al*, 2003. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA*; 289:2801-9.
12. Botchenko GV, Bochkov IA., Lugovskaia NN, Frolov SV, Drygin VV, Borisov AV, 2006. Biological properties of the chick bronchitis virus isolated in Russia. *Vopr Virusol*; 51(1) 45-8.
13. Brown WC, Bryton KA, Styer CM, Palmer GH, 1993. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit variant -specific proliferative and IFN-gamma responses in MSP2 vaccination. *J Immunol*; 170: 3790-3798.

14. Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, Collins PL, 2004. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 101(26):9804-9.
15. Buchwald UK, Lees A, Steinitz M and Pirofski L, 2005. A peptide mimotope of type 8 pneumococcal capsular polysaccharide induces a protective immune response in mice. *Infect Immun*; 73, 325-333
16. Butcher GD, Shapiro DP and Miles RD, 2002. *Bronchitis Virus: Classical and Variant Strains*. Ed. IFAS Extension, University of Florida USA.
17. Casais R, Dove B, Cavanagh D and Britton P, 2003. A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J Virol*; 77, 9084-9089.
18. Casey JL, Coley AM, Street G, Parisi K, Devine PL, Foley M, 2006. Peptide mimotopes selected from a random peptide library for diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol*; 44(3):764-71.
19. Cavanagh D and Naqi SA, 1997. *Infectious bronchitis* In: Calnek BW (ed) *Diseases of Poultry*, 10th ed. Mosby-Wolfe, London, pp 511-526.
20. Cavanagh D and Naqui S, 2003. *Infectious bronchitis*. In: Saif YM, Barnes HJ, Gisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) *Diseases in poultry*. Iowa State Press, Ames, 101-119.
21. Cavanagh D, 1981. Structural polypeptides of coronavirus IBV. *J Gen Virol*; 53(Pt 1):93-103.
22. Cavanagh D, 1983. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. *J Gen Virol*; 64 (Pt 12):2577-83.
23. Cavanagh D, 1985. Viral and bacterial vectors of immunogenes. *Vaccine*; 3(1):45-8.
24. Cavanagh D, 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus *Avian Pathol*; 32(6): 567-82. Review.
25. Cavanagh D, 2005. Coronaviruses of poultry and other birds. *Avian Pathol*; 34 (6), 439-448.
26. Cavanagh D, 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*; 38, 281-297.
27. Cavanagh D, Davis PJ and Cook JK, 1990. Molecular basis of the variation exhibited by avian infectious bronchitis coronavirus (IBV). *Adv Exp Med Biol*; 276:369-72.
28. Cavanagh D, Davis PJ, Darbyshire JH, Peters RW, 1986. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. *J Gen Virol*; 67(Pt 7):1435-42.
29. Cavanagh D, Davis PJ, Mockett AP, 1988. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res*; 11(2):141-50.
30. Cavanagh D, Davis PJ, Pappin DJ, Binns MM, Bournsnel ME, Brown TD, 1986. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-

- Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res*; 4(2):133-43.
31. Cavanagh D, Elus MM and Cook JKA, 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol*; 26:63-74.
 32. Cavanagh D, Mawditt K, Adzhar A, Gough RE, Picault JP, Naylor CJ, Haydon D, Shaw K, Britton P, 1998. Does IBV change slowly despite the capacity of the spike protein to vary greatly? *Adv Exp Med Biol*; 440:729-34.
 33. Cavanagh, D, Davis, P.J & Cook, JKA, 1992. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol*; 21: 401- 408.
 34. Chan SW and Nathan S, 2005. Epitope mapping of *Burkholderia pseudomallei* serine metalloprotease: identification of serine protease epitope mimics. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 43, 37-44.
 35. Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS, 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells*;14(2):295-9.
 36. Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, 2004. *Science*; 303:1666-69.
 37. Code of Federal Regulations (Title 9), 2007. *Animals and Animal Products. Pt. 200-End, Revised as of January 1, 2007 (English) USA.*
 38. Collisson EW, Parr RL, Li W, 1992. An overview of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. *Poult Sci Rev*; 4: 41-55.
 39. Cook JKA, 1984. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983 *Avian Pathol*; 13:733-741.
 40. Cook JKA, Chesher J, Baxendale W, Greenwood N, Huggins MB and Orbell SJ, 2001. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus *Avian Pathol*; 30:423-426.
 41. Cook JKA, Darbyshire JH and Peters RW, 1976. The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol*; 50: 109-118.
 42. Cook JKA, Orbell SJ, Woods M. and Huggins M, 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol*; 28:477-485.
 43. Corapi WV, Dartel RJ, Audonnet JC and Chappuis GE, 1995. Localization of antigenic sites of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus involved in neutralization and antibody-dependent enhancement. *J Virol*; 69:2858-2862.

44. Correa I, Jimenez G, Sune C, Bullido MJ, and Enjuanes L, 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res*; 10, 77-93.
45. Corse E, and Machamer CE, 2000. Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles. *J Virol*; 74:4319-4326.
46. Darbyshire JH, Cook JK, Peters RW, 1978. Growth comparisons of avian infectious bronchitis virus strains in organ cultures of chicken tissues *Arch Virol*; 56(4):317-25.
47. de Kruif J, Terstappen L, Boel E, Logtenberg T, 1995. Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92(9): 3938-42.
48. Deitsch KW, Moxon ER, Wellems TE, 1997. Sheared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Review, Microbiol Mol Biol*; 61:281.
49. Delmas B, Gelfi J, and Laude H, 1986. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J Gen Virol*; 67, 1405-1418.
50. Delmas B, Rasschaert D, Godet M, Gelfi J, and Laude H, 1990. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the aminoterminal half of spike glycoprotein S. *J Gen Virol*; 71, 1313-1323.
51. Ding Y, He L, Zhang Q, *et al*, 2004. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J Pathol*; 203(2):622-30.
52. Domanska-Blicharz K, Minta Z, Smietanka K and Porwan T, 2006. New variant of IBV in Poland. New variant of IBV in Poland. *Vet Rec*; 158 (23): 808.
53. Dorgham K, Dogan I, Bitton N, Parizot C, Cardona V, Debré P, Hartley O, Gorochoy G, 2005. Immunogenicity of HIV type 1 gp120 CD4 binding site phage mimotopes. *AIDS Res Hum Retroviruses*;21(1):82-92.
54. Dower WJ, Cwirla SE, 1994. Epitope mapping using libraries of random peptide displayed on phage. In: Wisdom GB, editor. *Peptide antigens: A practical approach*. Ed IRL Press, Oxford Univ Press New York, 219-43.
55. Drosten C, Gunther S, Preiser W *et al*, 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*; 348:1967-76.
56. Dybwad A, Bogen B, Natvig JB, Forre O, Sioud M, 1995. Peptide phage libraries can be an efficient tool for identifying antibody ligands for polyclonal antisera. *Clin Exp Immunol*; 102(2):438-42.
57. ENGORMIX, 2006. Available: http://www.engormix.com/s_avicultura.htm. [Acceso 20 Agosto 2006].

58. Escorcía SM, 1999. Caracterización molecular de virus de bronquitis infecciosa aviar de aislamiento en México. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Veterinarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
59. Escorcía M, Jackwood MW, Lucio B, Petrone VM, López C, Fehervari T, Tellez G, 2000. Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997. *Avian Dis*; 44(4):944-7.
60. Farsang A, Ros C, Renström LH, Baule C, Soós T, Belák S, 2002. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol*; 31(3):229-36.
61. Felsenstein J, 1989: PHYLIP: Phylogeny Inference Package. *Cladistics*; 5:164-166.
62. Folgiori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Galfré G, Cortese R, Monaci P and Nicosia A, 1994. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J*; 13(9):2236-43.
63. Galfre G, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Cortese R, 1996. Immunization with phage-displayed mimotopes. *Meth Enzymol*; 267:109-15.
64. Gallagher TM and Buchmeier MJ, 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*; 279:371.
65. Gazarian K, Gazarian T, Solís G, 2000. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immunol Lett*; 72:191-5.
66. Gazarian KG, Rowley MJ, Gazarian TG, Sotelo J, Garcia-Mendoza E, Hernandez R, 2001. Post-panning computer-aided analysis of phagotopes collections selected with neurocysticercosis patient polyclonal antibodies: separation of disease-relevant and irrelevant peptide sequences. *Comb Chem High Thr Screen*;4(3):221-35.
67. Gazarian T, Selisko B, Hérion O, Gazarian K, 2001. Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius*. *Mol Immunol*; 37:755-66.
68. Gelb J Jr, Ladman BS, Tamayo M, Gonzalez M, Sivanandan V, 2001. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. *Avian Dis*; 45(4):1060-3.
69. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol*. 1986 Jul;23(7):709-15.
70. Gharaibeh S, 2006. Infectious bronchitis virus serotypes in poultry flocks in Jordan. Ed *Preventive Veterinary Medicine*, 8p.
71. Gorbalenya AE, Suijder EJ and Spaan WJ, 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J Virol*; 78:7863-7866.

72. Greenwood J, Hunter GJ and Perham RN, 1991. Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and DNA. *J Mol Biol*; 217:223-227.
73. Guan Y, Zheng BJ, He YQ *et al*, 2003. Isolation and Characterization of Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. *Science*; 302:276-78
74. Guex N and Peitsch MC, 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*; 18, 2714-2723.
75. Hajjema BJ, Volders H and Rottier PJ, 2004. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol*; 78, 3863-3871.
76. Harlow E and Lane D, 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1st ed; 726 pages.
77. He Y, Lu H, Siddiqui P, Zhou Y, Jiang S, 2005. Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J Immunol*; 174(8):4908-15.
78. He Y, Zhou Y, Wu H, Luo B, Chen J, Li W, Jiang S, 2004. Identification of immunodominant sites on the spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: implication for developing SARS diagnostics and vaccines. *J Immunol*; 15; 173 (6):4050-7.
79. Hodgson T, Casais R, Britton P and Cavanagh D, 2004. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces good protective immunity. *J Virol*; 78, 13804-13811.
80. Hofstad MS, 1981. Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis*; 25(3):650-4.
81. Holmes KV, 2003. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J Clin Investig*; 111:1605-1609.
82. Hopp TP and Woods KR, 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78:3824-3828.
83. Humbert M, Antoni S, Brill B, Landersz M, Rodes B, Soriano V, Wintergerst U, Knechten H, Staszewski S, von Laer D, Dittmar MT, Dietrich U, 2007. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur J Immunol*; 37(2):501-15.
84. Ignjatovic J, McWaters PG, 1991. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strains. *J Gen Virol*; 72 (Pt 12):2915-22.
85. Ignjatovic J and Sapats S, 2005. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol*; 150:1813-31.

86. Ignjatovic J, Gould G and Sapats S, 2006. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol*; 151(8): 1567-85.
87. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2004. 19.0.1. Coronaviruses (on line). ICTVdB. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/19010000.htm> [Accessed: 20 January 2007].
88. INTERVET MEXICO, 2006. Available: <http://www.intervet.com.mx/species/poultry.asp>. [Accessed: 20 August 2006].
89. Jackwood MW, Hilt DA, Callison SA, 2003. Detection of infectious bronchitis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and identification of a quasispecies in the Beaudette strain. *Avian Dis*; 47(3):718-24.
90. Jackwood MW, Hilt DA, Lee CW, Kwon HM, Callison SA, Moore KM, Moscoso H, Sellers H, Thayer S, 2005. Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates. *Avian Dis* 49(4): 614-18.
91. Janin J, Wodak S, Levitt M and Maigret B, 1978. Conformation of Amino Acid Side-chains in Proteins. *J. Mol. Biol.* 125:357-386.
92. Johnson MA, Pooley C, Ignjatovic J, Tyack SG, 2003. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine*; 21(21-22):2730-6.
93. Jolivet-Reynaud C, Adida A, Michel S, Deléage G, Paranhos-Baccala G, Gonin V, Battail-Poirot N, Lacoux X, Rolland D, 2004. Characterization of mimotopes mimicking an immunodominant conformational epitope on the hepatitis C virus NS3 helicase. *J Med Virol*; 72(3):385-95.
94. Jonassen CM, Jonassen TO, Grinde B, 1998. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *J Gen Virol*; 79 (Pt 4):715-8.
95. Jones DT, 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*; 292. 195-202.
96. Jordi BJ, Kremers DA, Kusters HG, van der Zeijst BA, 1989. Nucleotide sequence of the gene coding for the peplomer protein (=spike protein) of infectious bronchitis virus, strain D274. *Nucl Ac Res*; 17(16):6726.
97. Julian RJ, Willis NG, 1969. The nephrosis-nephritis syndrome in chickens caused by a Holte strain of infectious bronchitis virus. *Can Vet J*; 10: 18-19.
98. Kant A, Koch G, van Roozelaar DJ, Kusters JG, Poelwi FAJ and van der Zeijst BAM, 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol*; 73: 591-96.

99. Karaca K, Naqi S, Gelb J Jr., 1992. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis*; 36(4):903-15.
100. Keeler CL Jr, Reed KL, Nix WA, Gelb J Jr., 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis*; 42(2):275-84.
101. Kingham BF, Keeler CL Jr, Nix WA, Ladman BS, Gelb J Jr, 2000. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis*; 44(2):325-35.
102. Knipe DM and Howley PM, 2001. *Fields Virology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins. Vol 1, 4th ed.
103. Koch G, Hartog L, Kant A, van Roozelaar DJ, 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J Gen Virol*; 71 (Pt 9):1929-35.
104. Kubo H, Yamada YK, Taguchi F, 1994. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J Virol*; 68(9):5403-10.
105. Kusters J, Jager E, Lenstra JA, Koch G, Posthumus WP, Meloen RH, van der Zeijst BA, 1989. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. *J Immunol*; 143: 2692-2698.
106. Kyte J and Doolittle RF, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*; 157:105-132.
107. Ladman B, Loupos A and Gelb J, 2006. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol*; 35(2), 127-133.
108. Landman WJM and Feberwee A, 2004. Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathol*; 33:591-598.
109. Larralde OG, Martinez R, Camacho F, Amin N, Aguilar A, Talavera A, Stott DI, Perez EM, 2007. Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity. *J Virol Methods*; 140(1-2):49-58.
110. Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW, 2003. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *J Vet Diagn Invest*; 15(4):344-8.
111. Lee ND, Hui A; Wu P; Chan P, Cameron GM, Joynt A, Ahuja MY, Yung CB, Leung KF, To SF, Lui CC, Szeto S, Chung A and Sung JJ. 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*; 348:1986-1994.
112. Lehmann D, Sodoyer R, Leterme S, 2004. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display. *Vet Microbiol*. 104(1-2):1-17.

113. Lenstra JA, Kusters JG, Koch G, van der Zeijst BA, 1989. Antigenicity of the peplomer protein of infectious bronchitis virus. *Mol Immunol*; 26(1):7-15.
114. Lewicki DN, Gallagher TM, 2002. Quaternary structure of coronavirus spikes in complex with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule cellular receptors. *J Biol Chem*; 277(22):19727-34.
115. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor, 2005. *Science*; 309(5742):1864-8.
116. Li G, Zhao Z, Chen L *et al.* 2003. Mild severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis*; 9:1182-83.
117. Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, Wong SK, Huang IC, Xu K, Vasilieva N, Murakami A, He Y, Marasco WA, Guan Y, Choe H, Farzan M, 2005. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J*; 24, 1634.
118. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C *et al.* 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*; 310(5748):676-9.
119. Li G, Chen X and Xu A, 2003. Profile of specific antibodies to the SARS associated coronavirus. *N Engl J Med*; 349:508.
120. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H and Farzan M, 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*; 426:450-454.
121. Lin CW, Wu SC, 2004. Identification of mimotopes of the Japanese encephalitis virus envelope protein using phage-displayed combinatorial peptide library. *J Mol Microbiol Biotechnol*; 8(1):34-42.
122. Liu SW, Zhang QX, Chen JD, Han ZX, Liu X, Feng L, Shao YH, Rong JG, Kong XG, Tong GZ, 2006. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch Virol*; 151(6):1133-48.
123. Marra MA, Jones SJ, Astell CR *et al.* 2003. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*; 300:1399-404
124. Mase M, Tsukamoto K, Imai K and Yamaguchi S, 2004. Phylogenetic analysis of infectious bronchitis virus strains isolated in Japan. *Arch Virol*; 149(10): 2069-78.
125. Matthijs MGR, van Eck JHH, Landman WJM, and Stegeman JA. 2003. *Avian Pathol*; 32: 473-481
126. McFerran and McNulty, 1993. *Virus Infections of Birds*. Ed Elsevier, The Netherlands. Vol 4: 247-271.
127. Meola A, Delmastro P, Monaci P, Luzzago A, Nicosia A, Felici F, Cortese R, Galfre G, 1995. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol*; 154(7):3162-72.

128. Mockett AP and Darbyshire JH, 1981. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay ELISA for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol*; 10:1-10
129. Mockett AP, Cavanagh D, Brown TD, 1984. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *J Gen Virol*; 65 (Pt 12):2281-6.
130. Moore KM, Jackwood MW, Hilt DA, 1997. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope within the s1 subunit of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol*; 142 (11):2249-56.
131. Nédellec P, Dveksler GS, Daniels E, Turbide C, Chow B, Basile AA, Holmes KV and Beauchemin N, 1994. Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family encodes an alternative receptor. *J Virol*; 68(7):4525-37
132. Nichol ST, Arikawa J, Kawaoka Y, 2000. Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(23):12411-2.
133. Nie QH, Luo KD, Zhang JZ and Su Q, 2003. Current status of severe acute respiratory syndrome in China. *World J. Gastroenterol*; 9:1635-1645.
134. Niesters HG, Bleumink-Pluym NM, Osterhaus AD, Horzinek MC, van der Zeijst BA, 1987. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology*; 161:2, 511-519.
135. Niesters HG, Lenstra JA, Spaan WJ, Zijderveld AJ, Bleumink-Pluym NM, Hong F, van Scharrenburg GJ, Horzinek MC, van der Zeijst BA, 1986. The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Res*; 5(2-3):253-63.
136. Palacios-Rodriguez Y, Gazarian T, Rowley M, Majluf-Cruz A, Gazarian K, 2007. Collection of phage-peptide probes for HIV-1 immunodominant loop-epitope. *J Microbiol Meth*; 68:225-35.
137. Parr RL and Collisior EW, 1993. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. *Arch Virol*; 133(3-4):369-83.
138. Parsons D, Ellis MM, Cavanagh D and Cook JKA, 1992. Characterisation of an avian infectious bronchitis virus isolated from IB-vaccinated broiler breeder flocks. *The Veterinary Record*; 131, 408-411.
139. Pensaert M and Lambrechts C, 1994. Vaccination of chickens against a Belgian nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus B1648 using attenuated homologous and heterologous strains. *Avian Pathol*; 23:631-641.
140. Petit MA, Jolivet-Reynaud C, Peronnet E, Michal Y, Trépo C, 2003. Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J Biol Chem*; 278(45):44385-92.

141. Prabakaran P, Gan J, Feng Y, Zhu Z, Choudhry V, Xiao X, Ji X, Dimitrov DS, 2006. Structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor-binding domain complexed with neutralizing antibody. *J Biol Chem*; 281(23):15829-36.
142. Pudney VA, Leese A, Rickinson and Hislop A, 2005. CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*; 201: 349-360.
143. Roccasecca R, Folgori A, Ercole BB, Puntoriero G, Lahm A, Zuchelli S *et al*, 2001. Mimotopes of the hyper variable region 1 of the hepatitis C virus induce cross-reactive antibodies directed against discontinuous epitopes. *Molec Immunol*; 38: 485-92.
144. Rosenberger JK, Alphin RL and Krauss WC, 1976. Cross-protection studies with a Holland strain (Nobilis H-52) of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*; 20: 199-201.
145. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS *et al*, 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*; 300: 1394-99
146. Sapats SI, Ashton F, Wright PJ, Ignjatovic J, 1996. Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis viruses: identification of a novel genotypic group in Australia. *J Gen Virol*; 77: 413-418.
147. Schalk AF and Hawn MC, 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journ. Am. Vet. Med. Assn*; 78:413.
148. Schikora BM, Shih LM and Hietala SK, 2003. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus California variants isolated between 1988 and 2001 based on the S1 subunit of the spike glycoprotein. *Arch Virol*; 148: 115-136.
149. Scott JK, Smith GP, 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*; 249(4967): 386-90.
150. Smith G, 2001. Selection versus design in chemical engineering. Nobel Centennial Symposia "Frontiers of Molecular Science" December 4-7, 2001.
151. Smith GP, 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*; 228(4705):1315-7.
152. Smith GP, Petrenko VA, 1997. Phage Display. *Chem Rev*; 97(2):391-410.
153. Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Meth Enzymol*; 217:228-57.
154. Solís CF, Ostoa-Saloma P, Lugo-Martínez VH, Johnston SA, Lalette JP, 2005. Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin. *Infect Immun*; 73(3):1895-7.

155. Song CS, Lee YJ, Lee CW, Sung HW, Kim JH, Mo IP, Izumiya Y, Jang HK and Mikami T, 1998. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. *J Gen Virol*; 79:719-723.
156. Spiga O, Bernini A, Ciutti A, Chiellini S, Menciacchi N, Finetti F, Causarono V, Anselmi F, Prischi F, Niccolai N, 2003. Molecular modelling of S1 and S2 subunits of SARS coronavirus spike glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*; 310(1):78-83.
157. Spiga O, Padula MG, Scarselli M, Ciutti A, Bernini A, Venditti V, Prischi F, Falciani C, Lozzi L, Bracci L, Valensin PE, Caudai C, Niccolai N. Structurally driven selection of human hepatitis C virus mimotopes, 2006. *Antivir Ther*; 11(7):917-22.
158. Stadler K, Massignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R., 2003. SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol*;1(3):209-18.
159. Stavriniades J, Guttman DS, 2004. Mosaic evolution of the severe acute respiratory syndrome coronavirus *J Virol*; 78(1):76-82.
160. Steffens WL, 1998. Available: <http://www.vet.uga.edu/IVCVM/1998/steffens/steffens.htm>. [Accessed: 13 January 2006].
161. Steward MW, Stanley CM, Obeid OE, 1995. A mimotope from a solid-phase peptide library induces a measles virus-neutralizing and protective antibody response. *J Virol*; 69(12):7668-73.
162. Stockman LJ, Bellamy R, Garner P, 2006. SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med*; 3(9): 343.
163. Sui J, Li W, Murakami A, Tamin A, Matthews LJ, Wong SK, Moore MJ, Tallarico AS, Olurinde M, Choe H, Anderson LJ, Bellini WJ, Farzan M, Marasco WA, 2004. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 2536.
164. Talbot PJ, Levy GA (Eds.), 1995. Corona and related viruses. Plenum Press, New York, pp. 95-98.
165. Thiel V (editor), 2007. Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology, 1st ed, Caister Academic Press.
166. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*; 22:4673-4680.
167. Toldo Luca, 1997. Antigenicity Plot based on C code. Available at: http://members.aol.com/ht_a/lucatoldo/myhomepage/laMBW/3/1/7/index.html. [Accessed: 1 December 2007]
168. Tripet B, Howard M, Jobling M, Holmes R, Holmes K., and Hodges R, 2004. Structural characterization of the SARS-Coronavirus Spike S fusion protein core. *J Biol Chem*; 279(20): 20836-20849.

169. Tripp RA, Haynes LM, Moore D, Anderson B, Tamin A et al, 2005. Monoclonal antibodies to SARS-associated coronavirus (SARS-CoV): identification of neutralizing and antibodies reactive to S, N, M and E viral proteins J Virol Meth; 128(1-2):21-8.
170. Tsai JC, Zelus BD, Holmes KB, Weiss SR, 2003. The N-terminal domain of the murine coronavirus spike glycoprotein determines the CEACAM1 receptor specificity of the virus strain. J Virol; 77, 841.
171. Tsui PT, Kwok ML, Yuen H and Lai ST, 2003. Severe acute respiratory syndrome: clinical outcome and prognostic correlates. Emerg Infect Dis; 9:1064-1069.
172. van den Brink EN, ter Meulen J, Cox F, Jongeneelen MAC, Thijsse A, Throsby M, Marissen WE, Rood PML, Bakker ABH, Gelderblom HR *et al*, 2005. Molecular and Biological Characterization of Human Monoclonal Antibodies Binding to the Spike and Nucleocapsid Proteins of Severe Acute respiratory Syndrome Coronavirus. J Virol; 79: 1635-1644.
173. Villegas P, 1998. Viral Diseases of the Respiratory System. Poult Sci; 77:1143-1145
174. Wang CH and Huang YC, 2000. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. Arch Virol; 145(2):291-300.
175. Wang L, Junker D, Cigainero T, Collison E, 1993. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. Virology; 192: 710-716.
176. Wang YS, Fan HJ, Li Y, Shi ZL, Pan Y, Lu CP, 2007. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus. Vaccine; 25(22):4447-55.
177. Weiss SR, Navas-Martin S, 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. Microbiol Mol Biol Rev; 69(4):635-64. Review.
178. Winter C, Schwegmann-Wessels C, Cavanagh D, Neumann U, Herrler G, 2006. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus J Gen Virol; 87(Pt 5):1209-16.
179. Wong KT, Antonio GE, Hui DS, Lee N, Yuen EH, Wu A, Leung CB, Rainer TH, Cameron P, Chung SS, Sung JJ, Ahuja AT, 2003. Thin-section CT of severe acute respiratory syndrome: evaluation of 73 patients exposed to or with the disease. Radiology; 228:395-400.
180. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007. Available at: <http://www.who.int/csr/sars/> [Accessed 27 February 2007].
181. Worthington KJ and Jones RC, 2006. New genotype of infectious bronchitis virus in chickens in Scotland. Vet Rec; 159(9): 291-2.
182. Xu Y, Liu Y, Lou Z, Qin L, Li X, Bai Z, Pang H, Tien P, Gao GF, Rao Z, 2004. Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core. J Biol Chem; 279: 30514-22.

183. Yang YK, Kim K, Jayaram M and Harshey RM, 1995. A domain sharing model for active site assembly within the Mu A tetramer during transposition: the enhancer may specify domain contributions. *EMBO J*; 14: 2374-2384.
184. Yao ZJ, Kao MC, Loh KC, Chung MC, 1995. A serotype-specific epitope of dengue virus 1 identified by phage displayed random peptide library *FEMS Microbiol Lett*; 127: 93-98.
185. Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT and Holmes KV, 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*; 357:420-422.
186. Yip YL, Ward RL, 1999. Epitope discovery using monoclonal antibodies and phage peptide libraries. *Comb Chem High Thr Screen*; 2(3):125-38. Review.
187. Yu XJ, Luo C, Lin JC, Hao P, He YY, Guo ZM, Qin L, Su J, Liu BS, Huang Y, Nan P, Li CS, Xiong B, Luo XM, Zhao GP, Pei G, Chen KX, Shen X, Shen JH, Zou JP, He WZ, Shi TL, Zhong Y, Jiang HL, Li YX, 2008. Putative hAPN receptor binding sites in SARS_CoV spike protein. *Acta Pharmacol Sin*; 24(6): 481-8.
188. Zucchelli S, Roccasecca R-M, Meola A, Ercole BB, Tafi R *et al*, 2001. Mimotopes of the hepatitis C virus hypervariable region 1, but not the natural sequences, induce cross-reactive antibody response by genetic immunization. *Hepatology*; 33(3):692-703.