



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

**“GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTE DE INFLUENZA
COMO PROTOTIPO DE VACUNA PARA GRIPE AVIAR Y
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE”**

PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

Biólogo

Andrade Potosí Elizabeth del Carmen

Nacipucha Mayancela Claudia Gabriela

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2017

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a nuestros profesores formadores que con gran vocación compartieron con nosotras sus conocimientos y fomentaron en nosotras el espíritu de la ciencia y la investigación desde nuestros primeros semestres.

A nuestro Tutor el Doctor Washington Cárdenas, de igual manera al Master Cesar Bedoya que con sus conocimientos supo guiarnos, a quienes agradecemos su tiempo invertido para que este proyecto se lleve a cabo.

A mis queridos compañeros y futuros colegas por todos sus consejos y apoyo recibido.

A nuestros familiares y amigos, por confiar y apoyarnos en todas las decisiones que hemos tomados a lo largo de toda nuestra vida, de no ser así, este trabajo no se lo hubiera logrado.

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedicamos a nosotras mismas por el esfuerzo, tiempo y dedicación invertida para que se hiciera realidad la culminación del trabajo, así como la culminación de una etapa más de nuestras vidas.

EVALUADOR DEL PROYECTO

Washington Cárdenas

Tutor Proyecto Integrador

Cesar Bedoya

Profesor Materia Integradora

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, me (nos) corresponde exclusivamente; y doy (damos) mi (nuestro) consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

.....
Elizabeth Andrade Potosí

.....
Claudia Gabriela Nacipucha

RESUMEN

El presente trabajo comprende una resolución clave aplicable para el tratamiento y control de las enfermedades virales de gripe aviar y enfermedad de Newcastle, que están vinculados al sector avícola y salud humana. La estrategia aplicada consiste en proponer el uso de técnicas de genética inversa, para la obtención de un modelo viable de virus recombinante que sirva como prototipo de vacuna, el cual será evaluado con ensayos de hemaglutinación para analizar cuantitativamente la carga viral. Los resultados representativos de nuestro modelo están adecuados para que el virus recombinante pueda generar el material vírico, ser ensamblado y producir las proteínas virales que le otorgan la propiedad infectiva en grandes concentraciones.

ÍNDICE GENERAL

.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA.....	iii
EVALUADOR DEL PROYECTO	iv
DECLARACIÓN EXPRESA.....	v
RESUMEN	vi
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
INTRODUCCIÓN.....	11
DECLARACIÓN DE OBJETIVOS:.....	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos.....	15
CAPÍTULO 1	16
1.1 Virus de la Influenza A.....	16
1.2 Virus Influenza H7N9.....	19
1.3 Enfermedad de Newcastle.....	19
1.4 Manipulación molecular	21
CAPÍTULO 2	23
2.1 Influenza aviar	23
2.2 Enfermedad de Newcastle.....	24
2.2.4.2 Infección de células de mamífero con el virus (MVA) ...	26
2.2.4.3 Transfección de células de mamíferos.....	26
2.2.4.4 Co-cultivo de células de mamífero con células aviar	26
2.2.4.5 Infección de huevos embrionados de pollo	26
2.2.4.6 Extracción de líquido alantoideo de huevos embrionados de pollo infectados ²⁷	26
CAPÍTULO 3	28
3.2 Enfermedad de Newcastle	31
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

ABREVIATURA

ARN	Ácido Ribonucleico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
cDNA	ADN complementario
F	Proteína de fusión
GE	Gen de parada
GI	Secuencia intergénica
GS	Gen de inicio
HEK	Human embryonic kidney cells
HN	Hemaglutinina-Neuraminidasa
HPAIV	Virus de Influenza Aviar altamente patógena
IA	Influenza aviar
IAV	Virus de Influenza A
K	Secuencias Kozak
L	Proteína polimerasa
MDCK	Madin Darby Canine Kidney Cell
M	Matriz
NP	Nucleoproteína
NDV	Enfermedad de Newcastle
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
P	Fosfoproteína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNP	Ribonucleoproteína
FDA	Food and Drug Administration

WHO World Health Organization

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de la organización genómica del virus Influenza A.....	16
Figura 1.2. Evolución genética del virus H7N9.....	18
Figura 1.3: Estructura y disposición de cada uno de los genes del virus de la Enfermedad de Newcastle.....	20
Figura 2.1 Modelos de los 4 plásmidos usados en el sistema de rescate de NDV.....	25
Figura 3.1 Secuencia del segmento 4 (Hemaglutinina) de influenza aviar que afecta a humano.....	28
Figura 3.2 Sistema de rescate propuesto para Influenza virus.....	29
Figura 3.3 Transfección en líneas celulares 293T/MDCK de 8 plásmidos para rescate de influenza virus.....	29
Figura 3.4 Representaciones esquemáticas del mecanismo de transcripción y replicación en un plásmido bidireccional.....	30
Figura 3.5 Modelo de rescate de virus de la enfermedad de Newcastle.....	31
Figura 3.6 Modelo de Transfección vírico de la enfermedad de Newcastle.....	32
Figura 3.7 Herramientas aplicadas para la recuperación de los virus y Hemaglutinación.....	33

INTRODUCCIÓN

La producción a gran escala de aves para consumo humano, a más de generar un importante aporte proteico como carne y sus derivados, genera diariamente grandes cantidades de dinero a nivel mundial, siendo una industria millonaria en los países con mayor demanda. Si bien es cierto la producción de aves de corral exige cuidados, controles y buen manejo, cada una de estas actividades son controladas a niveles de calidad demandados por entidades de salud pública [1]. Esta actividad industrial se ha visto amenazada por la presencia de enfermedades que afectan considerablemente y merman el desarrollo embrionario de aves de corral así como la mortalidad de las mismas a edad temprana. Estudios han señalado que la de patógenos específicos de aves se han esparcido en la mayoría de los continentes debido a la transición de especies de aves migratorias, lo que preocupa a los productores de aves a nivel mundial[2].

Entre las principales enfermedades reportadas sobresalen enfermedades causadas por virus de ARN de polaridad negativa como la Influenza Aviar subtipos H5 y H7 y el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), siendo importantes patógenos en aves de corral en todo el mundo [3]. No solo se han reportado casos donde las aves son las principales víctimas de estos patógenos, más de 200 casos humanos de infección por virus de influenza aviar han sido confirmados en todo el mundo, y la mayoría de los casos de infección son el resultado del contacto directo con aves de corral infectadas por el virus de la gripe aviar [4].

En caso específico de la influenza aviar conocida como gripe aviar la secuencia de reconocimiento de proteasa de la proteína HA es uno de los principales determinantes de patogenicidad del virus influenza aviar [5]. Donde la mayoría de las infecciones humanas se cree que surgen del contacto con aves de corral infectadas, siendo los virus H7N9 también han sido aislados de pollo y palomas [6].

El virus de la influenza A (IAV) constituye actualmente una amenaza en la salud pública que afecta a la población más vulnerable. Es considerada como la mayor causa de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, sólo en EEUU está estimado

que la influenza es la responsable de aproximadamente 20000 muertes cada año, causada por ambos tipos de virus que infectan humanos, influenza A e influenza B [7].

El subtipo H7N9 circulante en China se ha estimado 714 casos de infección en este año, que podría desarrollarse en aumento. No se han observado casos aislados a China sin embargo, se deben tomar las respectivas medidas preventivas en caso de que se desarrolle una pandemia respecto a nuevos virus. Según el comité de la FDA (Food and Drug Administration) se aprobaron por consenso que las cepas para la producción de vacunas trivalentes para el año 2017 sean cepas de California, Hong-kong y Brisbane [8].

La influenza es uno de los virus que puede adaptar mutaciones muy frecuentes para lograr replicarse, por lo que existen 2 tipos de influenza y 18 subtipos correspondientes a hemaglutinina diferentes que causan epidemias en humanos. Se cree que los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína hemaglutinina (HA) son los contribuyentes más importantes para la protección inmunitaria [9]. Actualmente la influenza de subtipo antigénico H7 es altamente patógena respecto a otros subtipos al ser transmitido de aves silvestres a aves de corral causando pandemias. En Ecuador hasta el 2015 han circulado 3 tipos: el AH3N2 con 53 casos detectados, influenza B con 61 casos y AH1N1 con 338 casos, los mismos que han causado 39 fallecidos en el país. Sin embargo, aunque la presencia de virus H7N9 aún no abarca las regiones de Ecuador, no se descarta el posible desencadenamiento de este virus. La población más susceptible al virus que como otros tipos de influenza se enfoca en niños de 6-59 meses y trabajadores del área de salud, así como también mujeres embarazadas y enfermos crónicos [10]. Las recomendaciones preventivas en el país consiste en lavar y desinfectar las manos, cubrirse la boca al toser preferiblemente con la parte interna del codo, en caso de fiebre y dolor de garganta acudir al médico [11].

Hasta la fecha, el virus A (H7N9) no ha sido reportado en poblaciones de aves de corral fuera de China; sin embargo, en países vecinos de China se ha intensificado la vigilancia, y varios países han impuesto una prohibición temporal de la importación de aves vivas de China [12]. Existen reportes de infecciones en humanos por el virus H7N9 de origen asiático fuera de China continental, pero la

mayoría de estas infecciones ocurrieron entre personas que viajaron a China continental antes de enfermarse [13].

La genética inversa describe una solución actual para la producción de vacunas recombinantes que pueden prevenir nuevas infestaciones virales al interferir en la función de los genes [14]. Mediante el cual, las técnicas eficaces en la recuperación del virus se simplifican en un sistema de rescate ambisense usando únicamente 8 plásmidos de transfección.

De tal forma existen medidas de contingencia en el cual consta la vacunación como una herramienta de prevención. Las vacunas se han trazado a través del período como aliados a la salud al tratar de evitar diversas enfermedades; sin embargo, la fabricación de las mismas conlleva una investigación detallada y eficiencia en el uso de métodos moleculares y genéticos. Además, los patógenos virales se encuentran en constante evolución para continuar infectando, lo que conlleva a requerir nuevos métodos genéticos para contrarrestarlos.

El desarrollo de vacunas vivas atenuadas efectivas es proporcionado por el uso de vectores de transfección bien establecidos, los componentes virales específicos (vacunas de subunidad) y el desarrollo de partículas virales a gran escala. El dominio de la vacuna tiene los beneficios de una alta inmunogenicidad, menores costes y facilidad de transporte y administración [15]. Una epidemia de gripe puede tener un impacto económico debido a la pérdida de productividad en la mano de obra y los servicios de salud determinados. Por ejemplo, en promedio anual entre el 5 y el 20 por ciento de la población estadounidense contrae la gripe, decenas de miles son hospitalizados y miles mueren por enfermedades relacionadas con la gripe. La estimación de este costo está entre \$ 10.4 mil millones al año en gastos médicos directos y \$ 16.3 mil millones adicionales en ganancias perdidas anualmente. Los propietarios empresariales desempeñarían un papel importante en la prevención de la gripe, si se prestara la protección adecuada de salud de los empleados con lo cual reduciría las pérdidas de productividad e ingresos [16].

Para la enfermedad de Newcastle (NDV), estudios muestran que su genoma vírico de cadena negativa, es susceptible de manipulación genética [17]. Debido a estudios realizados a nivel genómico del NDV como un vector vacunal [17], se derivan varias vacunas para proteger a las aves contra HPAIV, especificando hemaglutininas H5 o H7

[17], estas vacunas se basan en virus enteros inactivados. La construcción de vacunas de un NDV recombinante se basada en una cepa de vacuna viva lentógena disponible en el mercado que de manera eficiente protege a las aves contra los letales virus de influenza aviar y enfermedad de Newcastle y reduce a su vez la transmisión del virus de IA [17]. Estas vacunas pueden ser administradas por vías de aplicación en masa, tales como pulverización en agua potable [17].

Mediante el siguiente estudio se mediará una propuesta esquemática de la replicación de una cepa atenuada de virus influenza A subtipo H7 y una cepa de la Enfermedad de Newcastle, basada fundamentalmente en la recuperación de partículas virales con la estructura total a partir del sistema de rescate ambisense que influirá posteriormente en el desarrollo de un prototipo de vacuna. El análisis de ensayos serológicos con respuesta de altos títulos de partículas virales determinará posteriormente si la metodología es efectiva a priori a la nueva manifestación de epidemias de nuevos virus.

DECLARACIÓN DE OBJETIVOS:

Objetivo General

Diseñar un virus recombinante de influenza virus A y enfermedad de Newcastle como prototipo de vacuna.

Objetivos Específicos

- Establecer un modelo de sistema ambisense para el rescate de virus recombinante.
- Implementar herramientas de génica inversa para la obtención del virus recombinante.
- Determinar una propuesta de evaluación del modelo planteado del rescate de virus.

CAPÍTULO 1

INFORMACIÓN GENERAL

1.1 Virus de la Influenza A

1.1.1 Generalidades

1.1.1.1 Estructura

El virus de influenza constituye un miembro de la familia *Orthomyxoviridae* como virus monocatenario con ARN en sentido negativo y genoma segmentado [18][9][19][20][21][22]. La composición genética del virus permite que este virus evolucione con mayor fuerza por reordenamiento de segmentos de diferentes cepas. El virus consta de 8 segmentos en el que se encuentran un conjunto mínimo de proteínas virales. Este conjunto corresponde a las 3 subunidades de ARN viral dependiente, complejo ARN polimerasa (PBQ, PB2 y PA) y la nucleoproteína (NP). Procesos de encapsidación, transcripción y replicación del genoma viral es requerido por las proteínas [23].

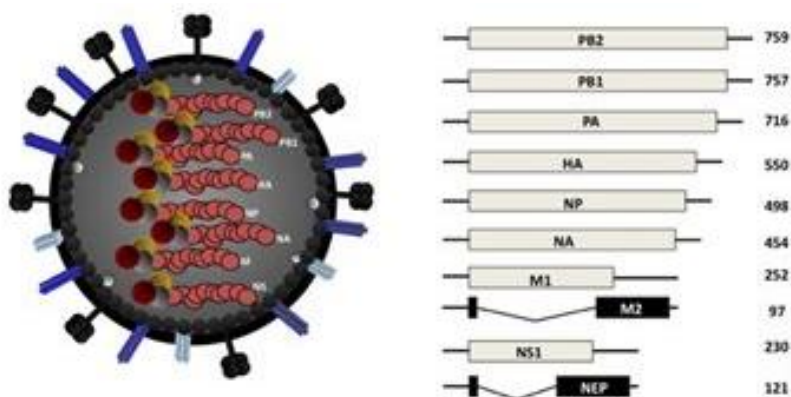


Figura 1.1: Estructura de la organización genómica del virus Influenza A (Martínez-Sobrido & García Sastre, 2010)

La hemaglutinina (HA) es la glicoproteína de conformación homotrímica que le otorga la formación de picos estructurales al virus [18]. Además se encarga de la fusión del receptor de unión y la membrana del virus de la influenza y es determinada como el objetivo para anticuerpos neutralizantes de infectividad [24].

1.1.1.2 Transmisión

La influenza A puede mantenerse en hospederos como aves migratorias o aves acuáticas, representando un reservorio en la naturaleza. En la actualidad se manifiestan por 15 hemagglutininas (HA) y 9 subtipos de neuraminidasa (NA) conformacionales de la estructura vírica que se han descrito en aves silvestres y aves de corral [25].

Los virus pertenecientes a los subtipos antigénicos H5 y H7, a diferencia de los virus que poseen otros subtipos de HA, pueden llegar a ser altamente patógenos. La transmisión desde aves silvestres a aves de corral la convierten en una plaga en constante contacto con el humano [26]. La baja patogenicidad del virus en las aves hospederas, se añade a la dificultad en la identificación de su propagación eficaz a nivel global a través de las aves infectadas. Además, los virus de influenza se encuentran en constante cambio y es posible que este virus adquiriera la capacidad de propagarse fácilmente y de manera sostenida entre las personas, desencadenando un brote mundial de la enfermedad como por ejemplo una pandemia [13].

1.1.1.3 Líneas celulares de transfección

En los últimos años, dos líneas de células continuas han sido aprobadas por las autoridades reguladoras para su uso en la producción de vacunas contra la gripe: Madin Darby riñón canino (MDCK) y células de origen africano de mono derivado de células Vero [27]. Las células MDCK se están considerando actualmente como una alternativa a los huevos embrionados para la propagación del virus de la gripe y la producción de hemagglutinina destinada a la fabricación de vacunas [27]. Considerando las limitaciones asociadas con las vacunas basadas en el uso de huevos, que incluyen suministros confiables de huevo, períodos prolongados de cultivo y operaciones incómodas han estimulado la búsqueda de alternativas eficaces de producción[28]. Las células MDCK son adecuadas para la producción de virus, pero su incapacidad para crecer en suspensión sin requerir adhesión superficial de proliferación limita la ampliación de producción a gran escala y, por tanto, su capacidad de producción [29][30]. La producción en suspensión sin suero se ha observado en otros estudios a partir de cultivos HEK-293, obteniendo como resultados experimentales altos títulos de virus de influenza infecciosos para

diferentes subtipos y variantes incluyendo cepas A / H1, A / H3 y B [31]. La innovación genética de la combinación de estas líneas celulares conformaría la producción de altos títulos virales importantes para cepas atenuadas y generación de vacunas recombinantes [23].

1.1.1.4 Incidencia epidemiológica

La hemaglutinina H7 considerada altamente patógena, se ha observado manifestada en infecciones humanas con virus de la gripe aviar A (H7N9). Este subtipo fue informado por primera vez a la OMS el 31 de marzo de 2013 [12], pero hasta ese momento los únicos reportes que existían sobre infecciones naturales de humanos por virus HPAI (highly pathogenic avian influenza) fueron casos de conjuntivitis asociadas con el virus aviar H7N7 transmitido ya sea directamente de aves a humanos o por alimentos [25].

La incidencia del virus influenza A H7N9 entre Enero y Febrero del 2017 abarcó un total de 304 casos confirmados por laboratorio y reportados a WHO, de los cuales 36 cesaron en muerte alrededor de China [8]. Además, existen observaciones estimadas de 714 casos por la OMS hasta el 8 de junio por el virus de origen asiático, que la apuntan como la 5ª epidemia de mayor magnitud hasta la fecha en China [13]

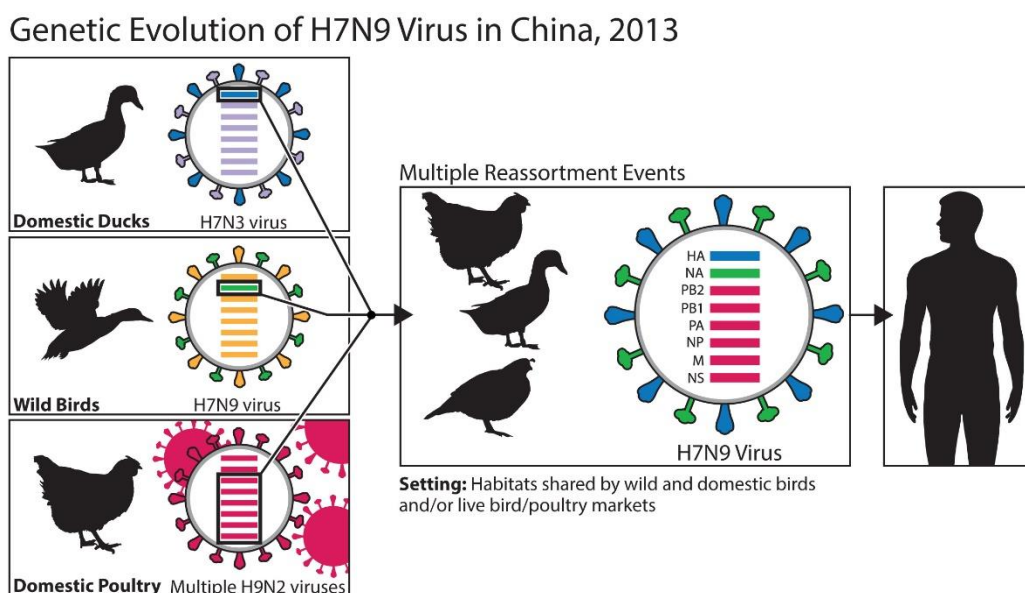


Figura 1.2: Evolución genética del virus H7N9, generada como virus recombinante a partir de la mezcla de 2 o más virus influenza que co-infectan un sólo hospedero [13]

1.2 Virus Influenza H7N9

La mayoría de las infecciones en humanos por los virus de la influenza aviar, como el H7N9 de origen asiático, se han desarrollado después de un contacto con aves de corral [21].

Los virus H7N9 de origen asiático circulan entre las aves de corral en China y los pacientes con infección por el virus H7N9 tienden a presentar enfermedades respiratorias graves (p. ej., neumonía) [32]. En China se registraron pocos casos de propagación limitada de persona a persona con este virus, pero no hay pruebas que demuestren una propagación sostenida entre personas [13].

Los virus de influenza A (H7N9) son enzoóticos en aves de corral en China y se han reorganizado con virus A (H9N2) para generar múltiples genotipos (Fig.1.2). Se ha demostrado por análisis filogenéticos que los genes hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) se agrupan y evolucionan en dos linajes en los árboles filogenéticos, Delta del Río Yangtze y Pearl River Delta [12]. Además, los aminoácidos en el sitio de escisión se han detectado en humanos, aves de corral y muestras ambientales de mercados de aves de corral vivos. Estas características incrementan el rango de tejido diana de alta patogenicidad para los virus aviares H5 y H7. El suceso de objetivos diana más amplios resulta en la replicación del virus en múltiples órganos y usualmente produciendo enfermedades sistémicas severas en pollos [33][31].

Las características anteriores clasifican al virus como HPAI (altamente patógenos) y como la Herramienta de evaluación del riesgo de influenza (IRAT, por sus siglas en inglés) al tener potencial para desencadenar una pandemia [12][13].

1.3 Enfermedad de Newcastle

El virus causante de la Enfermedad de Newcastle es un agente zoonótico económicamente relevante y por lo tanto ampliamente investigado y vigilado, que puede afectar gravemente la avicultura en todo el mundo [34].

1.3.1 Estructura

La enfermedad de Newcastle (NDV) es causada por un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, su genoma de ARN de cadena negativa, monocatenario y no segmentado, codifica ocho proteínas diferentes en seis unidades transcripcionales (Fig. 1.3), las cuales se expresan dependiendo su ubicación respecto al extremo 3' en un gradiente decreciente crítico para el ciclo de vida viral de NDV[34], rodeados por los promotores de la polimerasa viral leader y de trailer [35].

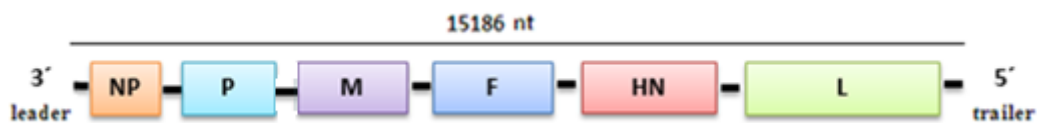


Figura 1.3: Estructura y disposición de cada uno de los genes del virus de la Enfermedad de Newcastle.

De las proteínas descritas en la Figura 1.3, tres de ellas forman parte del complejo de polimerasa viral Ribonucleoproteína (RNP), el cual permite transcribir y replicar el genoma vírico.

1.3.2 Cepas Víricas

Basados en la virulencia de cepas analizadas de pollos contagiados se las puede clasificar en tres tipos patológicos. La cepa lentogénica es conocida por presentar infecciones leves, sin síntomas, ampliamente usada como cepa vacunal para el tratamiento preventivo de la Enfermedad de Newcastle, la cepa mesogénica es causante de la enfermedad de severidad intermedia con baja mortalidad [5], mientras que la cepa velogénica es la cepa altamente patógena causa la mortalidad de las aves al poco tiempo de su infección, su manipulación requiere normas de alta bioseguridad.

1.3.3 Transmisión

La transmisión se da de ave a ave, se conoce que la enfermedad se ha esparcido siendo sus vectores aves migratorias. Hasta el momento no se ha reportado pruebas que muestren la transmisión del virus a través de huevos, en el caso que el embrión resultará infectado por cepas velogénicas este morirá antes de nacer.

Por razones económicas y prácticas, la destrucción de aves de corral infectadas, ya no se considera el método de elección para el control de esta enfermedad. Además, por razones

éticas y ecológicas, el sacrificio de aves de caza migratoria se considera una práctica inaceptable [3]

1.3.4 Patogenia e Incubación

Una vez el virus implantado en las vías respiratorias de aves hospedadoras, este inicia su replicación vírica en células epiteliales ubicadas en el tracto respiratorio hasta llegar al canal sanguíneo donde se dispersará al sistema nervioso central y así a todo el cuerpo del ave. El periodo de incubación varía entre 2 a 15 días.

1.4 Manipulación molecular

1.4.1 Genética inversa

El sistema de genética inversa ha permitido en el virus de influenza A, la manipulación del genoma viral. Este proceso puede reducir el número de plásmidos requeridos para la recuperación de virus de influenza A y permitir la generación de virus recombinantes que pueden manifestarse para la generación de prototipos vacunales [36].

En el caso de virus de influenza A 'Luytjes' y compañía primero describen un sistema de genética inversa (conocido como RNP de transfección) que se basa en la transfección de un complejo RNP reconstituido in vitro dentro de células auxiliares infectadas de influenza virus [37]. El sistema de transfección con 8 plásmidos ha sido requerido al aplicar la genética inversa para el rescate del virus de la influenza A infecciosa a partir del cDNA clonado [36].

El sistema de rescate ordena de tal modo los promotores de la polimerasa I y II y sus secuencias terminadoras para conllevar efectivamente la síntesis de ARN viral (-) y ARNm (+) a partir de plantillas de cDNA viral. El proceso es llevado a cabo por la interacción de factores moleculares derivados de la transcripción, que generan nuevos virus que infectarán otras células [23].

Cepas de influenza particularmente aquellas que comparten el tipo de hemaglutinina H5 con una diferente neuraminidasa han mostrado una mayor eficacia en el campo de genética inversa. Además, el mejor aprovechamiento es el uso de las técnicas aplicadas para crear un virus de influenza que tenga una hemaglutinina de interés

actual en una reserva genética que permita el crecimiento de altas concentraciones en huevos, pero baja patogenicidad ya sea en aves o especies mamíferas [38].

1.4.2 Vacunas recombinantes

Las vacunas recombinantes están determinadas por la capacidad en que uno o múltiples antígenos definidos puedan inducir inmunidad contra el patógeno. La administración de dichas vacunas en presencia de coadyuvantes o expresados por plásmidos o vectores bacterianos y virales inofensivos producen una respuesta inmunitaria propia del organismo [39] .

1.4.3 Medidas de contingencia

La producción de vacunas recombinantes se encuentra como una herramienta útil en la actualidad debido a que los casos de infección humana con el virus H7N9 está en auge. Por lo tanto se requiere plantear la bioseguridad como la primera línea de defensa en la prevención y el control de la influenza aviar HPAI.

Las acciones respectivas de mantenerse alerta a la llegada de un nuevo virus sostienen la vigilancia serológica de rutina, la notificación de enfermedades, el aislamiento o la cuarentena de las bandadas afectadas, la aplicación de medidas estrictas para prevenir la contaminación y el movimiento de personas y equipo en caso de reportarse dichos casos en nuestro país [40].

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Influenza aviar

2.1.1 Diseño y síntesis de H7 HA

Se sintetizará el gen de interés hemaglutinina de Influenza A como cDNA viral, a partir de secuencias extraídas del GenBank NCBI [41] correspondientes a subtipo Hemaglutinina 7 (H7) que afectan humanos (A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3) Accesion CY125728) de alta patogenicidad en la cual se añadirá una secuencia flanco de *Sap I* en extremos leader y trailer (Fig. 3.1). La secuencia es relacionada al continente Americano, mediante el cual se asegura la capacidad de obtener mi gen de interés para la investigación de un prototipo de vacuna relacionada a un posible brote local [42].

2.1.2 Clonación en vector pDZ de influenza virus

El sistema de rescate basado en ocho plásmidos pDZ consiste en un sistema ambisense diseñado con promotores bidireccionales, en el cual se producen tanto ARN en sentido viral y ARNm en sentido positivo para la producción de cada segmento genómico [36]. Por el cual se propone el siguiente sistema de rescate de H7 con enzima *Sap I* añadida, el cual se ajusta al polylinker dispuesto en mi plásmido pDZ luego de la respectiva digestión y ligación (Fig. 3.2) [43].

Los segmentos virales correspondientes a PB2, PB1, PA, NP, NA, M, NS para el desarrollo del virus completo serán construidos a partir de cDNAs desde cada segmento viral (generados por RT-PCR) con primers forward y reverse conteniendo el sitio de restricción *Sap I* y regiones UTR's (Fig. 3.1), los cuales se encuentran en cepas del laboratorio de Influenza A H3N2. El producto de PCR es ligado dentro de pDZ en orientación sense previamente digerido con *Sap I* (pDZ-PA, pDZ-HA, pDZ-NA, pDZ-PB1, pDZ-PB2, pDZ-M, pDZ-NS, pDZ-NP) y clonado en las células competentes. Obteniendo mi plásmido de interés se purifica y se continúa para transfectar con los protocolos respectivos de laboratorio.

2.1.3 Transfección y generación de virus.

Mediante la generación de segmentos víricos en cada transfección de plásmido en líneas celulares, da como resultado la producción de virus infeccioso de cepas H7 y H3N2 generando eficazmente cepas combinadas sin limitaciones y de estructura completa. La transfección se realizará en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células de riñón embrionario humano 293T, las cuales se mantienen bajo protocolos del laboratorio, dichas células se utilizarán en placas de cultivo de 24 pocillos, en el cual las líneas celulares se encuentran de 80-90% de confluencia con previa tripsinación [23]. La concentración de plásmidos añadida está previamente combinada con medio y en concentraciones de 0,5 y 1 µg/µl.

Luego del cocultivo con las líneas celulares 293T/MDCK, se infectarán con sobrenadante células MDCK que se incubaron con una capa de agarosa a concentraciones estables durante 3 días a 33°C. Para la infección de los huevos, los sobrenadantes de las células transfectadas se cosecharon 6 o 7 días después de la transfección, y 100 µl de las diluciones del virus en Opti-MEM I se inyectaron en huevos embrionados de pollo de 10 días a 33°C. El título se determinó 3 días después de la inoculación mediante el ensayo TCID₅₀ (cultivo de tejidos 50% de dosis infecciosa) en células MDCK[23].

2.1.4 Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo se realizará por ensayos de hemaglutinación y se comparara su crecimiento con un background de PR8 con las respectivas diluciones en medio PBS 1x, para analizar la concentración vírica en nuestras células [44][23].

2.2 Enfermedad de Newcastle

2.2.1 Construcción de NDV recombinante

El diseño de un virus recombinante como una solución viable para el control y prevención de Influenza altamente patógena tanto para aves como humanos se torna prometedora en el ámbito científico, es así que se desarrolló un virus de la Enfermedad de Newcastle recombinante que expresa el gen de la Hemaglutinina (HA) del virus de la influenza aviar subtipo H7[45], para lo cual se insertó entre los genes codificantes para Fosfoproteína (P) y Matriz (M) de la enfermedad de Newcastle cepa LaSota, , la secuencia génica de la

Hemaglutinina subtipo H7 que afecta a aves , (A / pollo / Tennessee / 17-008279-4 / 2017 (H7N9) extraída del GenBank de NCBI,

Médiate técnicas implementadas de genética inversa para el caso de los virus del genero Paramixovirus como NDV, se requiere para la transfección un mínimo de cuatro plásmidos [35], para lo cual tres de ellos son para la reconstrucción y replicación del complejo de polimerasa viral y el cuarto para la expresión vírica.

2.2.2 Construcción de los Plásmidos

El genoma completo y modificado de NDV cepa LaSota, se clona en el plásmido p-LaSota corriente abajo del promotor de polimerasa T7[35], para los genes que codifican la Nucleoproteína (NP), Fosfoproteína (P) y Polimerasa (L), se usan plásmidos p-TM1 clonados corriente abajo igual que el plásmido con el genoma completo.

Una vez construidos los plásmidos se transfectan en células eucariotas [35], y se transcriben mediante el sistema de polimerasa T7 [35], para lo cual el sistema de polimerasa T7 requiere el uso de un virus recombinante o una línea celular específica que expresa constitutivamente la enzima [35].

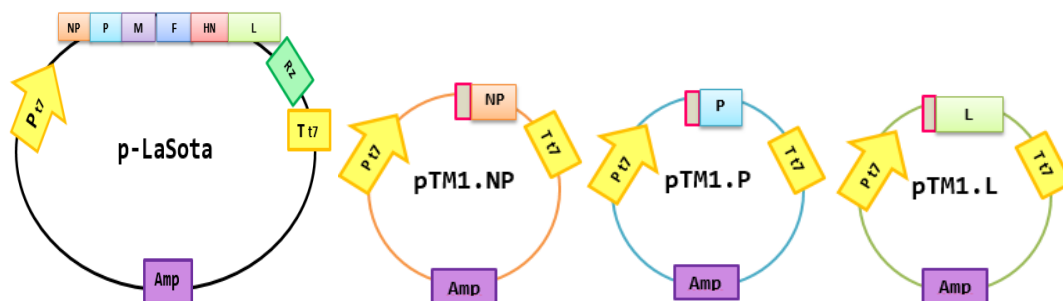


Figura 2.1: Modelos de los 4 plásmidos usados en el sistema de rescate de NDV

2.2.3 Sistema de Rescate

Se generó de manera artificial un ciclo de replicación viral en una célula productora de ADNc [34]. Una vez unido el virus a una célula diana, éste libera en el citoplasma su genoma asociado a las ribonucleoproteínas (RPN) víricas recombinantes, las cuales se transcriben gracias a la ARN polimerasa de ARN- a ARN mensajero viral y en una copia de ARNc + antígenomico de longitud completa [34], la misma que será usada como plantilla para la

producción de múltiples copias del genoma original que se incorporará en viriones nacientes[34], el ciclo termina con la liberación de virus recombinantes.

2.2.4 Transfección

2.2.4.1 Preparación de células de mamíferos

Se dispensa las células HEp-2 en placas de 6 pocillos de 100 mm (alrededor de 1×10^6 células por pocillo). Para cada virus a rescatar, se deben incluir 2-4 pocillos diferentes, así como 2 pozos adicionales para los controles[34].

2.2.4.2 Infección de células de mamífero con el virus (MVA)

Se calienta los medios de cultivo a 37°C , posteriormente se lavan las células con 1ml de cada medio, durante 1 hora a temperatura ambiente se infecta un volumen de 200ul de células de mamíferos cultivadas con el virus MVA-T7, se procede a incubar[34].

2.2.4.3 Transfección de células de mamíferos

Después de la incubación con MVA-T7, se retira el inóculo del virus por aspiración y se reemplaza una la mezcla de transfección de ADN(Ayllon, García-sastre, & Martínez-sobrido, 2013) previamente preparada. Se Incuban las células infectadas durante 6-8 h a 37 ° C, 5% CO₂ y luego reemplazar el medio de transfección con 1,5 ml de una nueva solución. Se Procede a co-cultivar las células transfectadas con fibroblastos aviares[34]

2.2.4.4 Co-cultivo de células de mamífero con células aviar

Se usa un plato de 100 mm de cultivo de tejidos de pollo (CEFs) o fibroblastos de embrión de pato (DEF)[34], los medios son potenciados con un 5% de fluido alantoideo y 30 mM de MgCl₂ [34]. Las células de mamífero y aviares son lavadas, separadas, resuspendidas y transferidas a platos de cultivo para ser incubadas.

2.2.4.5 Infección de huevos embrionados de pollo

Después de 3-4 días de co-cultivo las células de mamífero y aviar, se colocan en tubos Eppendorf, para ser centrifugadas para eliminar los desechos celulares. Los huevos son velados con una caja de luz para ver la interfaz entre el saco de aire y la cavidad alantoidea[34].Se hace agujero en la cáscara del huevo y se inocula 500 µl del sobrenadante con una jeringa de insulina (1 ml), apuntando la aguja vertical directamente en

la cavidad alantoidea. Sellar la cáscara de huevo con cera derretida o parafina Incubar los huevos durante 2-3 días a 37 ° C [34]

2.2.4.6 Extracción de líquido alantoideo de huevos embrionados de pollo infectados

Incubar los huevos infectados durante 2-4 horas con el fin de matar el embrión de pollo y coagular la sangre, agrietar la cavidad de aire (sección apical del huevo), exponer la cavidad alantoidea [34]. Se presiona cuidadosamente el embrión para recoger el líquido alantoideo con una pipeta de 10 ml, el líquido alantoideo se transfiere a un tubo de centrifuga de 15 ml por huevo, para aclarar el líquido alantoideo se Transfiere el sobrenadante a un tubo fresco, el cual se almacena a 4 ° C por hasta 1 semana [34]

2.2.4.7 Ensayo de hemaglutinación (HA)

La presencia de virus en el líquido alantoideo de los huevos infectados puede determinarse macroscópicamente por su capacidad para hemaglutinar los glóbulos rojos. En el caso del NDV, se requieren aproximadamente 10^6 unidades formadoras de placas (pfu) por ml para dar una señal positiva en el ensayo de HA [34]. Los ensayos de HA se llevan a cabo en placas de 96 pocillos de fondo en V. Siempre deben incluirse en cualquier ensayo de HA muestras de control negativo (líquido alantoideo no infectado) así como positivo (líquido alantoideo de cualquier virus NDV) para validarlo [34].

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE RESULTADOS

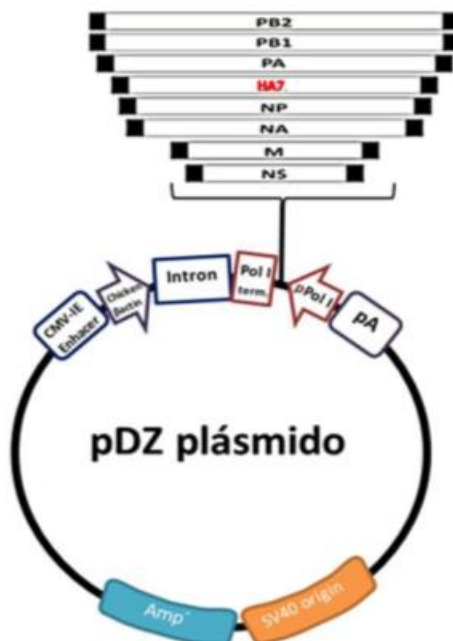
3.1 Influenza A

```

1  5'GCTCTCCGGGA 3' agcaaaagca ggggatacaa aatgaacact .....
    Sap I
1621 ttatggttta gcttcggggc atcatgtttt cttcttctag ccattgcaat gggattggtt
1681 ttcatttgca taaagaatgg aaacatgctg tgcaactattt gtatatagtt tgagaaaaaa
1741 acacccttgt ttctact ATAAGGAAGAGC 3'
                        Sap I
  
```

Figura 3.1.1. Secuencia del segmento 4 (Hemaglutinina) de influenza aviar que afecta a humano (A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)) con secuencia *Sap I* añadida sintética. Accesion: CY125728.1

A.



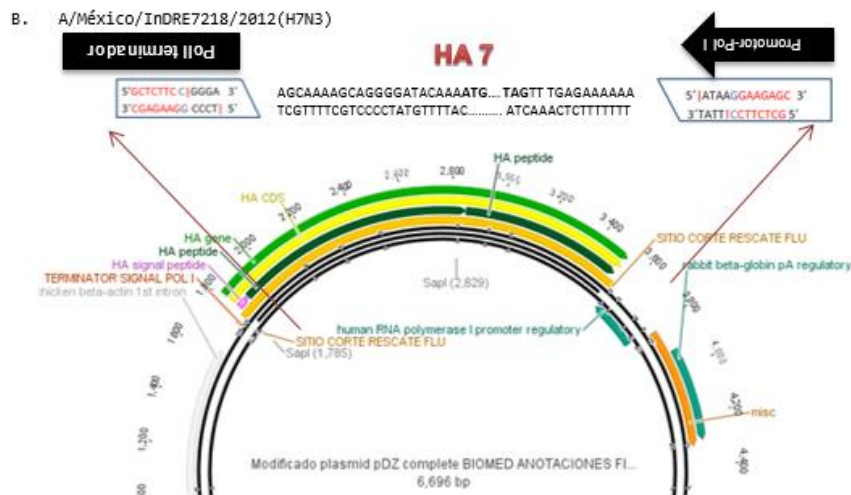


Figura 3.1.2. A. Sistema de rescate propuesto para Influenza virus: Los ocho genes de Influenza virus clonados dentro de plásmido ambisense pDZ están ubicados de tal forma que, se realice la codificación de ARN genómico en sentido negativo con la ayuda de un promotor de polimerasa I y una secuencia terminador de ratón; y en opuesta orientación a la polimerasa I, el cassette de polimerasa II entra en acción para transcribir proteínas virales del mismo gen viral. **B.** Disposición de gen HA7 con secuencia Sap I, insertado en el plásmido pDZ previamente digerida con Sap I (Geneious V8.1.9) [46].

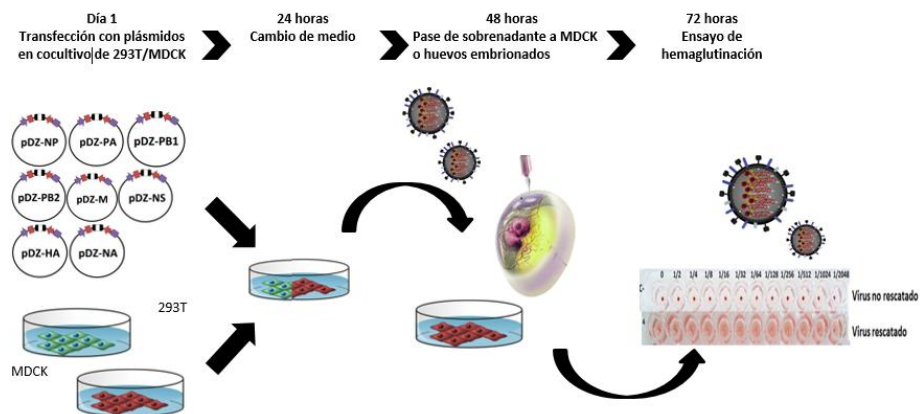


Figura 3.1.3. Transfección en líneas celulares 293T/MDCK de 8 plásmidos de rescate. Luego de transfectar con los plásmidos pDZ de los 8 genes víricos, se cambia el medio más tripsina. 48 horas después el sobrenadante del cultivo de tejido pasa a infectar MDCK o huevos embrionados de 8-10 días. 48 -72 horas después el sobrenadante infectado es analizado por ensayo de hemaglutinación para comprobación de títulos virales.

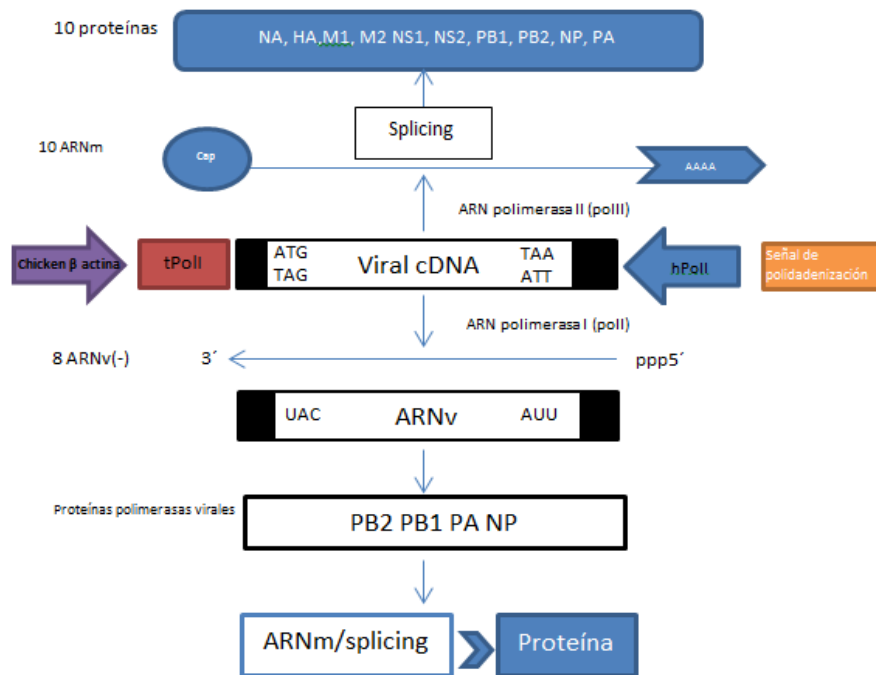


Figura 3.1.4. Representaciones esquemáticas del mecanismo de transcripción y replicación en un plásmido bidireccional. El plásmido donde se clonan nuestros 8 genes es derivado de pCAGGs (plásmido de expresión de proteína), y la transfección de los mismos se realiza dentro del núcleo de las células eucariota. El promotor de ARN polimerasa I humano y una secuencia de terminador de ratón codifican el ARN genómico de sentido negativo. Los factores de transcripción de la polimerasa II, promotor de β -actina de pollo y terminador poli A, codifican las proteínas virales (complejo de proteínas) del mismo gen viral. Después de la síntesis de éstas proteínas virales, se inicia la replicación viral, continuando con el ensamblaje de todas las moléculas virales directamente (transcripción pol II) o indirectamente (transcripción pol I y replicación viral) derivada de los resultados de la maquinaria celular de transcripción y traducción en la interacción de todas las moléculas sintetizadas (vRNPs y las proteínas estructurales HA, NA, M1, M2, NS2/NEP) para generar virus influenza A infeccioso.

3.2 Enfermedad de Newcastle

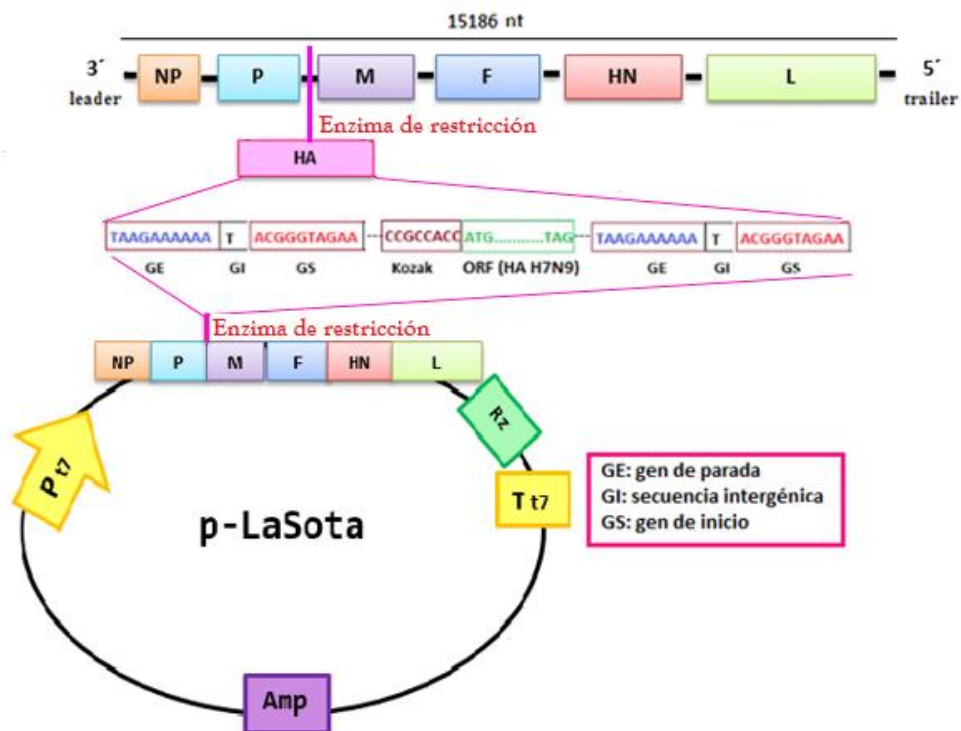


Figura 3. 2.1. Modelo de rescate de virus de la enfermedad de Newcastle.

El sistema consta con un mínimo de 4 plásmidos, de los cuales 3 se encargan de transcribir y replicar el genoma vírico mediante el sistema de Ribonucleoproteínas (NP, P y L), se digiere el genoma de NDV mediante enzimas de restricción, usando como promotor T7 y terminador T7, se inserta el disco con todos nucleótidos, entre los genes que codifican a la proteína fosfoproteína y proteína de matriz.

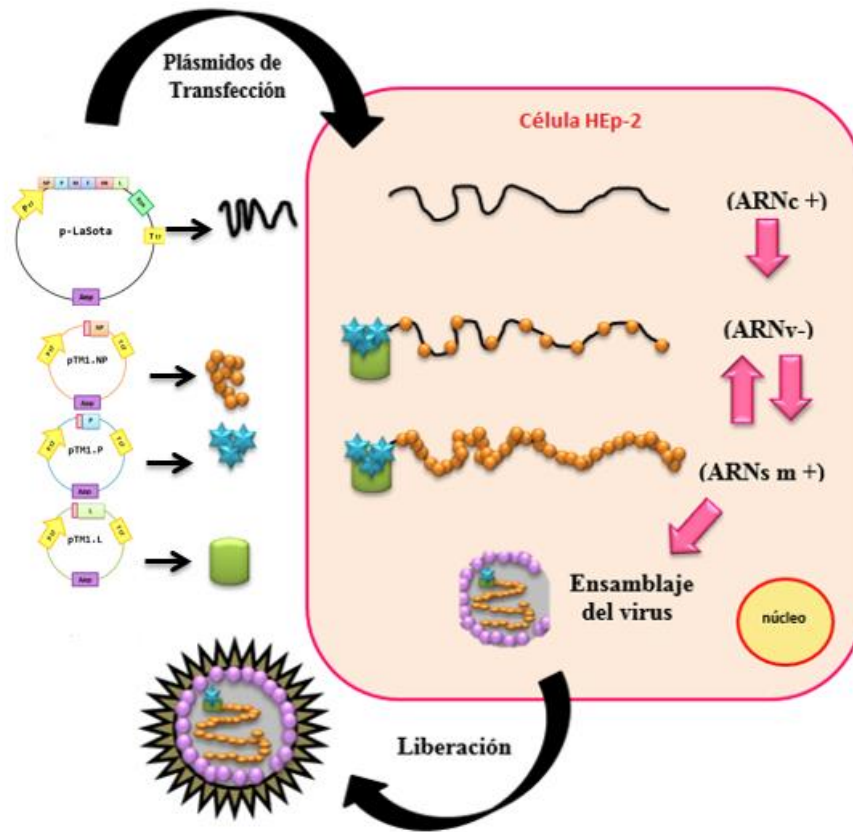


Figura 3.2.2. Modelo de Transfección vírica de la enfermedad de Newcastle

Una vez contruidos los 4 plásmidos, 1 con el genoma recombinante de NDV y 4 con las proteínas estructurales, estas al encontrarse en presencia de células HEp-2 siguiendo el ciclo para la formación de segmentos de ARN vírico. La secuencia recombinante completa de NDV se transcribe y replica en el citoplasma de las células, debido a que NDV es un virus de polaridad negativa, para generar ARNs mensajeros virales, pasa de ARNc+ a ARNV- este a su vez sirve de tándem para generar los ARNs, una vez estructuradas las proteínas los virus son ensamblados y listos para ser liberado.

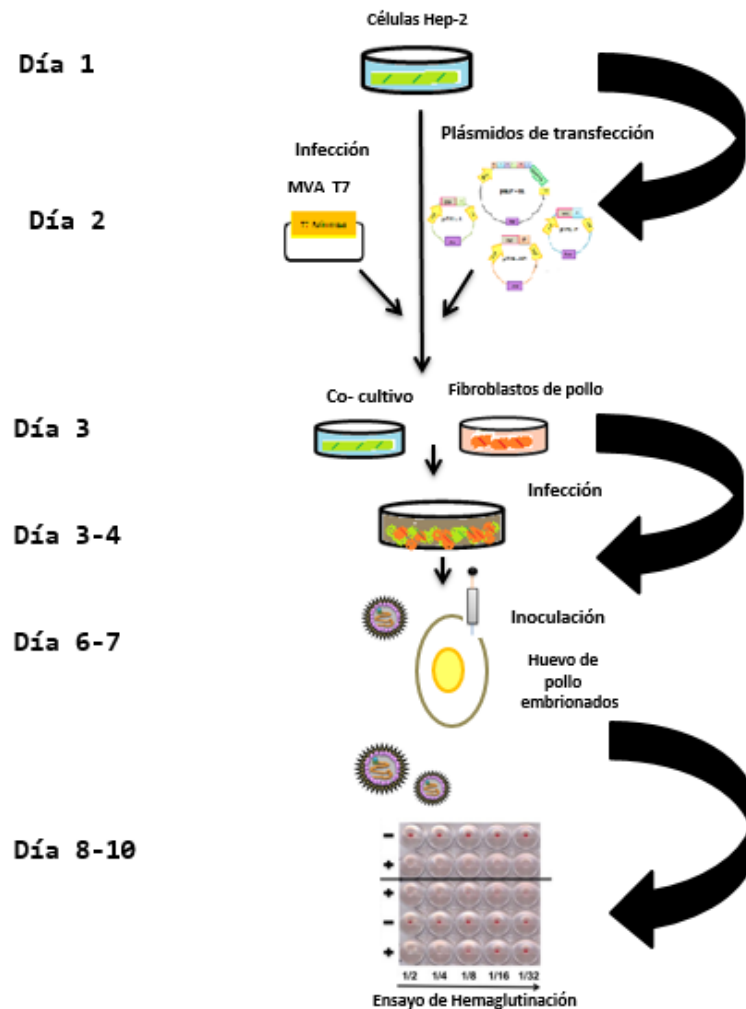


Figura 3.2.3. Herramientas aplicadas para la recuperación de los virus y Hemaglutinación. Una vez liberados los nuevos virus estos son recolectados para transfectar células de mamíferos, así como células aviares como fibroblastos de pollos, las células pasan por varios procesos de lavado, centrifugación, una vez las células listas pasan a inoculación siendo inyectadas en huevos de pollos embrionados, en los cuales los genomas víricos reaccionaran en un tiempo estimado, posterior a la incubación se extrae de los huevos el líquido alantoico el cual será sometido a ensayo de hemaglutinación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Se diseñó los modelos de virus recombinantes como prototipos vacunales para el tratamiento y control de enfermedades causantes de grandes pérdidas económicas en la producción avícola, así como causantes de enfermedades humanas, facilitado por la implementación de herramientas de genética inversa.
2. Se representó esquemáticamente la propuesta de modelo de sistema de rescate, para generar virus recombinantes con gen sintético de Hemaglutinina subtipo H7. Determinando una propuesta metodológica viable mediada por búsqueda bibliográfica para la transfección de plásmidos que generarán nuevos virus infecciosos.
3. Se generó una propuesta de evaluación comprobará la efectividad del método, mediante la titulación viral por inhibición de hemaglutinación.

Recomendaciones

1. Si se inserta un nuevo gen en el genoma de NDV, este debe ubicarse aguas arriba (upstream) del nuevo (ORF), para que sea leído por la polimerasa el extremo del gen de parada (GE) y el inicio del nuevo gen (GS), separados por un nucleótido o secuencia intergenica (IG).
2. Para una replicación eficiente de NDV se debe tomar en cuenta que la longitud de su genoma sea múltiplo de seis, si es necesario, mediante mutagénesis silenciosa se puede eliminar secuencias o añadir nucleótidos aguas abajo (downstream) del nuevo (ORF)
3. Para una mejor expresión de la proteína extraña es recomendable colocar la secuencia Kozak (K), que mejora la traducción.
4. Mejorar el sistema de rescate para NDV usando un sistema de dos plásmidos, para mayor viabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Gao *et al.*, “Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 20, pp. 1888–1897, 2013.
- [2] S. H. Kim and S. K. Samal, “Newcastle disease virus as a vaccine vector for development of human and veterinary vaccines,” *Viruses*, vol. 8, no. 7, 2016.
- [3] M.-S. Park, J. Steel, A. García-Sastre, D. Swayne, and P. Palese, “Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 21, pp. 8203–8, 2006.
- [4] J. Ge *et al.*, “Newcastle Disease Virus-Based Live Attenuated Vaccine Completely Protects Chickens and Mice from Lethal Challenge of Homologous and Heterologous H5N1 Avian Influenza Viruses,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 1, pp. 150–158, 2007.
- [5] J. M. DiNapoli *et al.*, “Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccines Expressing the Hemagglutinin or Neuraminidase Protein of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Protect against Virus Challenge in Monkeys,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 3, pp. 1489–1503, 2010.
- [6] P. H. Goff *et al.*, “Induction of Cross-Reactive Antibodies to Novel H7N9 Influenza Virus by Recombinant Newcastle Disease Virus Expressing a North American Lineage H7 Subtype Hemagglutinin,” *J. Virol.*, vol. 87, no. 14, pp. 8235–8240, 2013.
- [7] E. Hoffmann, K. Mahmood, C. Yang, R. G. Webster, H. B. Greenberg, and G. Kemble, “Rescue of influenza B virus from eight plasmids,” vol. 38163, no. 19, 2002.
- [8] CDC and Ncird, “Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)—United States, 2017-18 Summary of Recommendations,” *MMWR Recomm Rep*, vol. 66, no. 2, pp. 1–20, 2017.
- [9] N. Pica and P. Palese, “Toward a Universal Influenza Virus Vaccine: Prospects and Challenges,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 64, pp. 189–202, 2013.
- [10] Ministerio de Salud Pública, “Medidas de prevención contra la Influenza,” 2015. [Online]. Available: <http://www.salud.gob.ec/medidas-de-prevencion-contra-la-influenza/>. [Accessed: 27-Sep-2017].
- [11] El Telégrafo, “En Ecuador circulan 3 tipos de influenza, según el MSP,” 2016.

- [Online]. Available: <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/4/en-ecuador-circulan-3-tipos-de-influenza-segun-el-msp>. [Accessed: 27-Sep-2017].
- [12] World Health Organization, "WHO | Analysis of recent scientific information on avian influenza A(H7N9) virus," *WHO*, 2017.
- [13] Centros para el control y la prevención de enfermedades, "Virus de la influenza aviar A (H7N9) de linaje asiático | Influenza aviar (gripe)," 2017. [Online]. Available: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/avianflu/h7n9-virus.htm>. [Accessed: 26-Jun-2017].
- [14] M. B. Tierney and K. H. Lamour, "An Introduction to Reverse Genetic Tools for Investigating Gene Function," *The American Phytopathological Society*, 2005. [Online]. Available: <https://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/ReverseGeneticTools.aspx>. [Accessed: 11-Jul-2017].
- [15] C. C. Stobart and M. L. Moore, "RNA virus reverse genetics and vaccine design," *Viruses*, vol. 6, no. 7, pp. 2531–2550, 2014.
- [16] N.-A. M. Molinari *et al.*, "The annual impact of seasonal influenza in the US: Measuring disease burden and costs," *Vaccine*, vol. 25, no. 27, pp. 5086–5096, Jun. 2007.
- [17] J. Veits *et al.*, "Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 21, pp. 8197–8202, 2006.
- [18] T. Samji, "Influenza A : Understanding the Viral Life Cycle," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 82, pp. 153–159, 2009.
- [19] Y. Fujii, H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida, and Y. Kawaoka, "Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 4, pp. 2002–2007, Feb. 2003.
- [20] S. Fields and G. Winter, "Nucleotide sequences of influenza virus segments 1 and 3 reveal mosaic structure of a small viral RNA segment.," *Cell*, vol. 28, no. 2, pp. 303–13, Feb. 1982.
- [21] U. Desselberger, V. R. Racaniello, J. J. Zazra, and P. Palese, "The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity.," *Gene*, vol. 8, no. 3, pp. 315–28, Feb. 1980.
- [22] E. Fodor, L. Devenish, O. G. Engelhardt, and P. Palese, "Rescue of Influenza A Virus

- from Recombinant DNA,” vol. 73, no. 11, pp. 9679–9682, 1999.
- [23] L. Martínez-Sobrido and A. García-Sastre, “Generation of Recombinant Influenza Virus from Plasmid DNA,” *J. Vis. Exp.*, no. 42, pp. 5–9, 2010.
- [24] J. J. Skehel and D. C. Wiley, “Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 69, no. 1, pp. 531–569, Jun. 2000.
- [25] R. A. M. Fouchier *et al.*, “Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 5, pp. 1356–1361, 2004.
- [26] A. D. A. Senne *et al.*, “Survey of the Hemagglutinin (HA) Cleavage Site Sequence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses : Amino Acid Sequence at the HA Cleavage Site as a Marker of Pathogenicity Potential,” *Avian Dis.*, vol. 40, no. 2, pp. 425–437, 1996.
- [27] I. Hamamoto, H. Takaku, M. Tashiro, and N. Yamamoto, “High Yield Production of Influenza Virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Cells with Stable Knockdown of IRF7,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, 2013.
- [28] C. Chu, V. Lugovtsev, H. Golding, M. Betenbaugh, and J. Shiloach, “Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 35, pp. 14802–14807, 2009.
- [29] M. J. Hossain, S. Perez, Z. Guo, L.-M. Chen, and R. O. Donis, “Establishment and Characterization of a Madin-Darby Canine Kidney Reporter Cell Line for Influenza A Virus Assays,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 7, pp. 2515–2523, Jul. 2010.
- [30] E. Milián *et al.*, “Accelerated mass production of influenza virus seed stocks in HEK-293 suspension cell cultures by reverse genetics,” *Vaccine*, vol. 35, no. 26, pp. 3423–3430, Jun. 2017.
- [31] A. Le Ru, D. Jacob, J. Transfiguracion, S. Ansoerge, O. Henry, and A. A. Kamen, “Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing,” *Vaccine*, vol. 28, no. 21, pp. 3661–3671, 2010.
- [32] World Health Organization, “WHO | Human infection with avian influenza A(H7N9) virus – China,” *Dis. outbreak news*, 2017.
- [33] K. Subbarao *et al.*, “Evaluation of a Genetically Modified Reassortant H5N1 Influenza A Virus Vaccine Candidate Generated by Plasmid-Based Reverse Genetics,” vol. 200,

- pp. 192–200, 2003.
- [34] J. Ayllon, A. García-sastre, and L. Martínez-sobrido, “Rescue of Recombinant Newcastle Disease Virus from cDNA 2 . Infection of Mammalian Cells with the Recombinant Modified Vaccinia Ankara Virus Expressing the Bacteriophage T7 RNA Polymerase (MVA-T7) (Figure 4A , Day 2),” no. October, pp. 1–9, 2013.
- [35] H. Liu, E. Albina, P. Gil, C. Minet, R. Servan, and D. Almeida, “Two-plasmid system to increase the rescue efficiency of paramyxoviruses by reverse genetics : The example of rescuing Newcastle Disease Virus,” vol. 509, no. June, pp. 42–51, 2017.
- [36] E. Hoffmann, G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, and R. G. Webster, “A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 11, pp. 6108–6113, 2000.
- [37] S. Pleschka, R. Jaskunas, O. G. Engelhardt, T. Zürcher, and P. Palese, “A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus . These include: A Plasmid-Based Reverse Genetics System for Influenza A Virus,” vol. 70, no. 6, 1996.
- [38] D. Middleton *et al.*, “Efficacy of inactivated vaccines against H5N1 avian influenza infection in ducks,” vol. 359, pp. 66–71, 2007.
- [39] I. P. Nascimento and L. C. C. Leite, “Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies,” *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 45, no. 12, pp. 1102–1111, 2012.
- [40] D. A. Halvorson, “The control of H5 or H7 mildly pathogenic avian influenza : A role for inactivated vaccine The control of H5 or H7 mildly pathogenic avian influenza : a role for inactivated vaccine,” *Avian Pathol.*, vol. 31, no. 1, 2002.
- [41] D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and D. L. Wheeler, “GenBank.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. Database issue, pp. D34-8, Jan. 2005.
- [42] L. Young and Q. Dong, “Two-step total gene synthesis method,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 7, pp. 1–6, 2004.
- [43] H. F. Lodish, *Molecular cell biology*. W.H. Freeman, 2000.
- [44] J. C. Pedersen, “Hemagglutination-Inhibition Test for Avian Influenza Virus Subtype Identification and the Detection and Quantitation of Serum Antibodies to the Avian Influenza Virus,” in *Avian Influenza Virus*, Totowa, NJ: Humana Press, 2008, pp. 53–66.

- [45] D. Schröder *et al.*, “Vaccination with Newcastle Disease Virus Vectored Vaccine Protects Chickens Against Highly Pathogenic H7 Avian Influenza Virus Vaccination with Newcastle Disease Virus Vectored Vaccine Protects Chickens Against Highly Pathogenic H7 Avian Influenza Virus,” vol. 53, no. 2, pp. 190–197.
- [46] A. (Kears, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Mentjies, P.; Drummond, “Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.,” 28, 2012.