



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DEL VIRUS DE  
LA INFLUENZA PORCINA EN MÉXICO CON LA  
TÉCNICA DE RT-PCR RFLP's**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**PAULINA ÁVALOS GUZMÁN**

**TUTOR: Dra. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA**

**COMITÉ TUTORAL: Dr. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT**

**Dra. SUSANA MENDOZA ELVIRA**

**MÉXICO, D. F.**

**2012**

---



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.



## DEDICATORIA

*Esta tesis está dedicada principalmente a mis padres y a mi hermana, que aunque estemos separados físicamente, es ahora cuando estamos más unidos como familia.*

---

## AGRADECIMIENTOS

*A DIOS, por ser mi principal guía, por darme la fuerza necesaria para salir adelante y lograr alcanzar esta meta. Gracias a él, he podido superar las pruebas que la vida me ha mandado.*

*A los que me han acompañado durante el largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación.*

*Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt quien no sólo me ha orientado en todo momento en la realización de este proyecto, sino también es una persona muy valiosa en mi vida, pues además de asesor es también un amigo.*

*A la Dra. María Elena Trujillo Ortega por su contribución en la realización de este proyecto.*

*A la Dra. Susana Mendoza Elvira por su valioso apoyo y por sus atenciones en este proyecto.*

*Al MVZ. Ciro Martínez por el apoyo brindado para la colección de muestras en rastro.*

*Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza por los conocimientos, el apoyo y por las atenciones brindadas en el laboratorio.*

*Al Dr. Enrique Corona Barrera por las facilidades otorgadas en Mérida, Yucatán.*

*A la M.C. Rosalba Carreón Nápoles quien siempre se mostró con la mejor disposición a enseñarme muchas cosas, una de ellas fue la técnica de RFLP's.*

*A la M.C. María del Carmen Mercado García por su valioso apoyo en el aislamiento viral y en general en el área de laboratorio.*

*A los miembros del jurado: Dr. Abel Ciprian Carrasco, Dr. Enrique Salas Téllez y la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, a ustedes muchas gracias.*

---

*Al MC Gabriel Iván Pantoja Núñez, por la hospitalidad y atenciones prestadas en mi estancia en Mérida Yucatán, y especialmente a su madre.*

*Al pMC Rolando Beltrán Figueroa compañero de la Maestría, equipo de trabajo y amigo.*

*Al Dr. Germán Borbolla Sosa, fuente de consejos y guía para seguir adelante. A usted, muchas Gracias.*

*Al MC Arturo Alonso Pesado, profesor del área de economía, maestro muy querido y también, muchas gracias por el apoyo moral.*

*Al Dr. Rigoberto Hernández Castro, por su apoyo brindado durante la edición de este trabajo.*

*A mis amigos: Pamela Espinosa, Jaqueline Zúñiga, Adriana Franco, Gabriela Falcón, Mayra Sierra, Erika Hernández, César Esparza. Muchas gracias por estar conmigo siempre.*

*A la Sra. Carmen Díaz y la Sra. Evelia Hernández personal del área de laboratorio, personas muy importantes y que gracias a ellas el paso por el laboratorio siempre tiene un ambiente musical y de armonía.*

*Nuevamente, GRACIAS a todos ustedes que directa o indirectamente colaboraron de algún modo en la realización de este proyecto.*

El presente trabajo fue financiado por el Consejo De Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. I0110/184/09 FON. INS, 29/09 y por el proyecto del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) No. PICSA11-19

El alumno fue becario del Sistema Nacional de Becas de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 297049.

---

## RESUMEN

La influenza porcina es una enfermedad viral que afecta a una gran variedad de especies. La alta capacidad mutacional del virus, las alteraciones generadas por recombinación interespecie de material genético, y el amplio número de especies que afecta, son factores que favorecen su efectiva transmisión y propician la generación de nuevos serotipos de alta patogenicidad y alta capacidad de transmisión entre especies incluyendo al humano. De un total de 1246 muestras pulmonares provenientes de rastro, 791 muestras resultaron positivas al virus de la influenza porcina con la técnica de RT PCR en Tiempo Real dirigido hacia el gen M, lo que representa una prevalencia del 63.48%. Once aislamientos virales de un total de treinta y tres resultaron positivos para el gen N1, 6 para H1N1 y 3 para H3N2, lo que representa un 33, 18 y 9% respectivamente. En el resto de las muestras no fue posible identificar amplicones para H1, H3, N1 y N2. Se realizó la digestión enzimática a siete amplicones de N1 con las enzimas: *BsgI*, *HaeIII*, *HpaII* y *MboII*. Los patrones de corte obtenidos con las diferentes enzimas fueron similares a los que se dilucidaron con el programa clone manager, excepto los patrones de corte obtenidos con la enzima *MboII*. Se observó que con la enzima *MboII* es posible identificar cepas con variaciones que caen en el sitio blanco de la enzima, obteniendo 4 cepas con diferencias en los patrones de corte de un total de 7.

Palabras clave: Influenza porcina, qRT-PCR, RFLP's, digestión enzimática.



## ABSTRACT

Porcine influenza is a viral disease that affects a great variety of species. The high mutation rate of the virus, its capacity to modify its genetic material by recombination with other influenza-virus species and the broad number of hosts that can infect; are the main factors that allow the virus to have a very effective transmission rate; those factors are also involved in the generation of new highly pathogenic and contagious serotypes that can infect several species including humans

A total of 1246 lung samples from different slaughterhouses were used in this study. 791 samples (63.48%) out of the total were positive to porcine influenza using the real time RT-PCR (qRT PCR) aimed to the M gen. All the positive samples were inoculated in chick embryos which resulted in 33 influenza isolates where 11 (33%) were positive for the N1 gen, 6 (18%) for H1N1 and 3 (9%) for H3N2. It was not possible to identify any amplicons of H1, H3, N1 and N2 in the rest of the samples. After an enzymatic digestion of 7 amplicons of N1 using *BsgI*, *HaeIII*, *HpaII* y *MboII* enzymes, it was observed that the cutting pattern was similar to the simulation produced with the Clone Manager software, with exception of the pattern produced by the *MboII* enzyme. It was observed that with the *MboII* enzyme, it is possible to identify strains with variations that are located in the target sequence of this enzyme; getting up to 4 strains with differences in the digestion pattern from a total of 7.

Key words: Porcine Influenza, qRT-PCR, RFLP's, enzymatic digestion.

---

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
CONTENIDO.....	vii
INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y CUADROS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
ETIOLOGÍA.....	2
ORTHOMIXOVIRUS.....	2
ORGANIZACIÓN GENOMICA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA.....	3
SEGMENTO 1.....	3
SEGMENTO 2.....	3
SEGMENTO 3.....	4
SEGMENTO 4.....	4
SEGMENTO 5.....	7
SEGMENTO 6.....	7
SEGMENTO 7.....	9
SEGMENTO 8.....	10
DATOS DE EVOLUCIÓN GENÉTICA.....	14
INFLUENZA EN ANIMALES DOMÉSTICOS.....	17
HISTORIA DE LA INFLUENZA EN EL CERDO.....	20
HISTORIA DE LA INFLUENZA TIPO A EN HUMANOS.....	26
INFLUENZA H1N1 2009.....	28
DESVIACIÓN ANTIGÉNICA.....	31
CAMBIO ANTIGÉNICO.....	31
REPLICACIÓN DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA.....	32
VARIANTES.....	36
MODIFICACIÓN DEL RECEPTOR.....	36
ACTIVIDAD ANTIVIRAL, SUPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO.....	37
ESCAPE INMUNE.....	38
RESISTENCIA A AMANTADINA.....	39

RESISTENCIA A OSELTAMIVIR .....	40
DIAGNÓSTICO .....	41
RFLP´s.....	42
JUSTIFICACIÓN.....	44
HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVO GENERAL .....	44
MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL.....	46
PCR EN TIEMPO REAL .....	46
AISLAMIENTO VIRAL.....	48
ONE STEP RT-PCR .....	48
OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS .....	52
SELECCIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .....	59
MAPAS DE DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	62
VARIABLES DE ESTUDIO: .....	63
RESULTADOS.....	64
IDENTIFICACIÓN DEL GEN M.....	73
IDENTIFICACIÓN DE AMPLICONES DE N1:.....	77
CORTES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .....	78
DISCUSIÓN .....	83
CONCLUSIONES .....	86
REFERENCIAS .....	88

## INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y CUADROS

<i>Fig. 1 Virus de la influenza tipo A</i> .....	2
<i>Fig. 2 Estructura del virus de la influenza</i> .....	3
<i>Fig. 3 Estructura del precursor HA0</i> .....	6
<i>Fig. 4 Representación esquemática de la activación del plasminógeno</i> .....	9
<i>Fig. 5 Segmentos de ARN del genoma del virus de la Influenza tipo A</i> .....	12
<i>Fig. 6 Comparación de los virus de la influenza A, B y C</i> .....	12
<i>Fig. 7 Similitudes entre las secuencias de los virus de Influenza A y B</i> .....	13
<i>Fig. 8 Análisis filogenético de secuencias del gen HA</i> .....	13
<i>Fig. 9 Mapa de la región del estrecho de Bering</i> .....	19
<i>Fig. 10 Rutas de aves migratorias</i> .....	20
<i>Fig. 11 Fenotipos del virus de influenza que infectan a los cerdos alrededor del mundo</i> .....	22
<i>Fig. 12 Representación esquemática de las especies afectadas por los virus de la influenza</i> .....	23
<i>Fig. 13 Mapa de subtipos aislados del cerdo</i> .....	26
<i>Fig. 14 Historia esquematizada de las Pandemias de la Influenza tipo A</i> .....	28
<i>Fig. 15 Origen del virus pandémico A H1N1</i> .....	29
<i>Fig. 16 Representación esquemática de receptores de NAc <math>\alpha</math> 2,3 Gal y NAc <math>\alpha</math> 2,6 Gal en el cerdo</i> .....	33
<i>Fig. 17 Replicación de los virus de influenza</i> .....	36
<i>Fig. 18 Función de la proteína M2 en la replicación viral. Rol de la amantadina como antiviral</i> .....	40
<i>Fig. 19 Función de la neuraminidasa en la replicación viral. Rol del fármaco oseltamivir como antiviral</i> .....	41
<i>Fig. 20. Condiciones de RT PCR One Step</i> .....	49
<i>Fig. 21. Controles positivos</i> .....	51
<i>Fig. 22. Mapa de la procedencia de las secuencias obtenidas del Gen Bank</i> .....	54
<i>Fig. 23. Mapa de alineación de los oligonucleótidos H1 F y H1 R</i> .....	55
<i>Fig. 24. Mapa de alineación de los oligonucleótidos H3 F y H3 R</i> .....	56
<i>Fig. 25. Mapa de alineación de los oligonucleótidos N1 F y N1 R</i> .....	57
<i>Fig. 26. Mapa de alineación de los oligonucleótidos N2 F y N2 R</i> .....	58
<i>Fig. 27. Mapa de alineación de los oligonucleótidos del gen M</i> .....	59
<i>Fig. 28. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Bsg I</i> .....	62
<i>Fig. 29. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Hae III</i> .....	62
<i>Fig. 30. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Hpa II</i> .....	62

Fig. 31. Patrón de corte del amplicon del N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Hinc II.....	62
Fig. 32. Patrón de corte del amplicon del N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Mbo II.....	63
Fig. 33. Prevalencia del virus de la influenza porcina mediante qRT-PCR.....	65
Fig. 34. Mapa de muestreo.....	66
Fig. 35. Controles positivos de H1N1, H3N2 y control vacunal de H1N1.....	71
Fig. 36. Muestras de campo con diferentes pares de oligonucleótidos.....	72
Fig. 37. RT PCR Punto final en muestras de campo (0 – 36).....	73
Fig. 38. RT PCR Punto final en muestras de campo (37 – 66).....	74
Fig. 39. RT PCR Punto final en muestras de campo (67 – 74).....	75
Fig. 40. Gen N1 de muestras de campo con diferentes pares de oligonucleótidos.....	76
Fig. 41. Identificación del gen N subtipo 1 en muestras de campo.....	77
Fig. 42. Patrones de corte. Gen N subtipo 1 de los controles de referencia y la vacuna.....	78
Fig. 43. Corte del amplicon de N1 con la enzima BsgI.....	79
Fig. 44. Corte del amplicon de N1 con la enzima HaeIII.....	80
Fig. 45. Corte del amplicon de N1 con la enzima HpaII.....	81
Fig. 46. Corte del amplicon de N1 con la enzima MboII.....	82

Cuadro 1 Datos evolutivos de los genes de la Influenza.....	15
Cuadro 2 Datos de evolución de los genes M y NS del virus de la influenza.....	17
Cuadro 3 Datos de origen del pH1N1.....	30
Cuadro 4 Cambios Antigénicos significantes por año.....	32

Tabla 1 Condiciones de amplificación Tiempo Real.....	47
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para detectar los genes H1, N1, H3, N2 del virus de la influenza porcina.....	52
Tabla 3. Oligonucleótidos (a) sintetizados para detectar el gen H subtipo 1 del virus de la influenza porcina.....	52
Tabla 4. Oligonucleótidos (b) sintetizados para detectar el gen H subtipo 1 del virus de la influenza porcina.....	52
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para detectar el gen M del virus de la influenza.....	53

---

<i>Tabla 6. Patrones de corte del amplicon del gen H1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo [A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)]. Amplicon de 1006 pb.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 7. Patrones de corte del amplicon del gen H3 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo [A/Swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)]. Amplicon de 663 pb.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 8. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo [A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)]. Amplicon de 754 pb.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 9. Patrón de corte del amplicon del gen N2 de la secuencia de referencia utilizada como control [A/Swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)]. Amplicon de 502 pb.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 10 Muestreo a nivel de rastro .....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 11. Esquema de resultados.....</i>	<i>68</i>



---

## INTRODUCCIÓN

El virus de la Influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, son viriones envueltos de cadena sencilla. Se clasifican en tres tipos, A, B y C. Los virus de la influenza Tipo A se agrupan posteriormente en subtipos antigénicos de acuerdo con la glucoproteína específica que presenten y se le conocen como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se han encontrado 16 tipos de hemaglutininas y 9 neuraminidasas. La Influenza tipo A afecta al humano, mamíferos y aves. <sup>(1) (2) (3)</sup>

Debido a que el genoma es segmentado, la evolución continua de los virus de la Influenza es mucho mayor en las glucoproteínas de superficie, pero también ocurre en menor grado en cada uno de los ocho segmentos génicos. <sup>(2)</sup>

La redistribución es un mecanismo importante para la producción rápida de la diversidad viral, por que se produce entre los virus de la Influenza tipo A en la naturaleza y es importante en la aparición de pandemias en las poblaciones humanas. <sup>(2)</sup>

Los virus de influenza fueron aislados a principios del siglo 20 de los pollos (A/Brescia/1902 [H7N7]), de cerdos en la década de 1920, de los humanos a principios de 1930, de los caballos y los patos domésticos en la década de 1950, de las golondrinas de mar en 1961, y de muchas aves acuáticas y costeras desde 1974 <sup>(4) (5)</sup> Los virus de la Influenza han estado disponibles desde la década de 1950, dichos virus se mantuvieron inicialmente por pasajes de animal a animal y más tarde por congelación a bajas temperaturas (-70 ° C). <sup>(6)</sup>

Esta variabilidad da como resultado la acumulación de cambios moleculares en los ocho segmentos de ARN y pueden ocurrir por una serie de diferentes mecanismos que incluyen (i) mutaciones puntuales (deriva antigénica), (ii) reordenamiento del gen (cambio genético), (iii) defectos de interferencia de partículas y la recombinación del ARN. <sup>(1) (6)</sup>



Cada uno de estos mecanismos puede contribuir a la evolución de los virus de la influenza. Las mutaciones, incluyendo sustituciones, eliminaciones e inserciones, son uno de los mecanismos más importantes para producir variaciones en los virus de la influenza. <sup>(6)</sup>

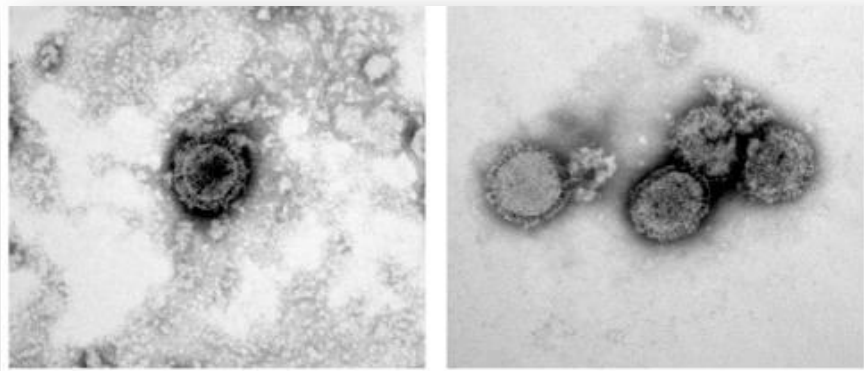
La falla en la corrección de las ARN polimerasas contribuye a la aparición de errores de replicación, siendo estos de hasta  $1 \times 10^4$  bases por cada ciclo replicativo. <sup>(7)</sup> <sup>(8)</sup> Esto contrasta con la fidelidad de replicación que es mayor entre las ADN polimerasas, es decir, los errores pueden ser de  $1 \times 10^9$  bases por ciclo de replicación. Cada ciclo replicativo genera una población mixta con muchas variantes, la mayoría de las cuales no son viables. <sup>(6)</sup>

## ETIOLOGÍA

### ORTHOMIXOVIRUS

Los *Orthomyxoviridae* son virus pequeños (80 a 120 nm de diámetro), son partículas pleomórficas que luego se vuelven esféricas. El genoma de los virus de la Influenza A está formado por ocho segmentos de cadena sencilla de ARN. <sup>(6)</sup>  
Véase **Fig. 1**

*Fig. 1 Virus de la influenza tipo A*

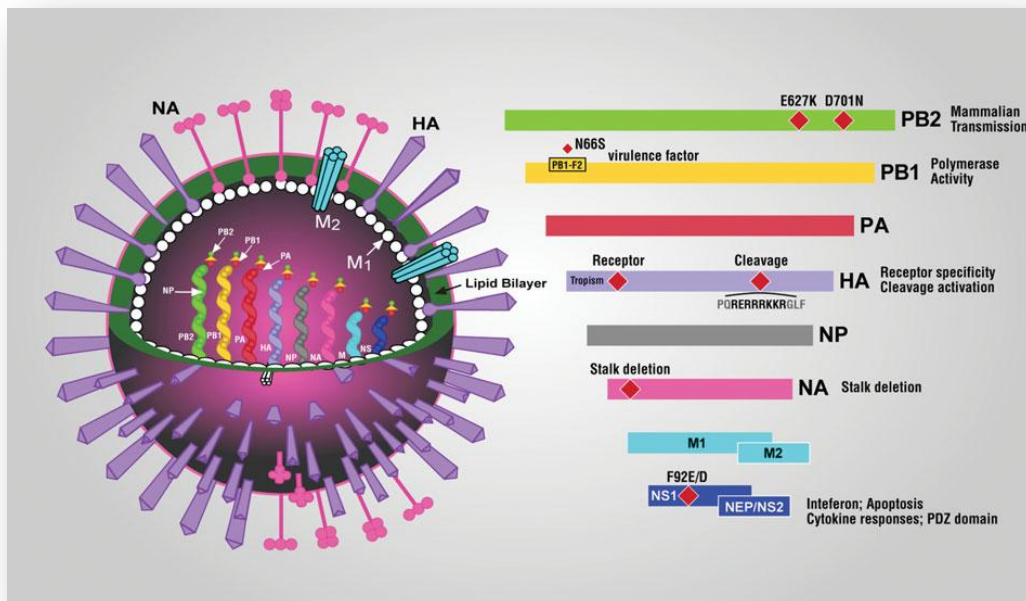


Tomado de: Lakdawala SS, Lamirande EW, Suguitan AL Jr, Wang W, Santos CP. Eurasian-Origin Gene Segments Contribute to the Transmissibility, Aerosol Release, and Morphology of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. <sup>(9)</sup>

## ORGANIZACIÓN GENOMICA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

Los ocho segmentos de ARN del virus de la Influenza codifican para 10 proteínas. Se trata de tres polimerasas (PB1, PB2 y PA) la hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA), proteínas M1 y M2 y las proteínas no estructural NS1 y NS2. <sup>(6), (10), (11)</sup> Véase **Fig. 2**

Fig. 2 Estructura del virus de la influenza



Tomado de: Robb NC, Smith M, Vreede F T, Fodor E. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus ARN genome. (12)

### SEGMENTO 1

Codifica para la polimerasa PB2, se trata de un miembro del complejo proteínico viral de la polimerasa. Sus funciones son reconocer la estructura 5' de los ARNm de la célula huésped para posteriormente unirse a él durante el inicio de la transcripción del ARNm viral. Las proteínas recién sintetizadas por PB2 migran al núcleo de las células infectadas. <sup>(6) (13) (14) (15)</sup>

### SEGMENTO 2

Codifica para la polimerasa PB1, participa también en el complejo de la polimerasa y es la proteína responsable de la elongación del ARNm viral que recién migró al núcleo, también como proteína de elongación de la plantilla de ARN y síntesis ARN viral. La proteína PB1 se localiza en el núcleo de las células infectadas. <sup>(6) (14)</sup>

### SEGMENTO 3

Codifica para la polimerasa (PA). Se localiza en el núcleo de la célula infectada y es miembro del complejo ARN polimerasa junto con PB1 y PB2. Su papel en la síntesis de ARN viral se desconoce. Hay evidencia de posibles funciones como una proteína quinasa o como una proteína desenrolladora de hélice. <sup>(6) (13) (14)</sup>

### SEGMENTO 4

Codifica para la proteína Hemaglutinina (HA). La proteína HA es una proteína integral de membrana y es el antígeno de superficie principal del virus de la influenza. <sup>(6)</sup> Es responsable de la unión de los viriones a los receptores celulares y también participa en la fusión de la envoltura viral a la célula huésped. <sup>(13)</sup> Sufre tres tipos de procesamiento postraduccionales: división proteolítica, glicosilación y acilación de ácidos grasos. Los nuevos sintetizados de HA se escinden para eliminar la secuencia hidrofóbica amino-terminal de 14 a 18 aminoácidos, la cual es la secuencia señal para el transporte a la membrana celular. <sup>(6)</sup>

La Hemaglutinina HA0 del virus de la influenza es un precursor biosintético, es una glicoproteína unida a la membrana viral y su secuencia de anclaje transmembrana es cercana a la terminal COOH. Este precursor sufre un corte o escisión por proteasas extracelulares, lo que resulta en la formación de dos subunidades llamadas HA1 y HA2, eliminando así los residuos de arginina, lo que los separa del precursor. <sup>(16) (17)</sup> La terminal amino de HA2 recién formada tiene una secuencia no polar llamada péptido de fusión. El corte es esencial para la infectividad del virus, su potencial es activado cuando la HA es inducida a pH bajo por endosomas, lo que conduce a cambios conformacionales irreversibles en la molécula. Estos cambios son requeridos para la entrada del virus a la célula. Los

---

cambios conformacionales y el corte extracelular se correlacionan con la patogenicidad del virus. <sup>(17)</sup> <sup>(18)</sup> Véase **Fig. 3**

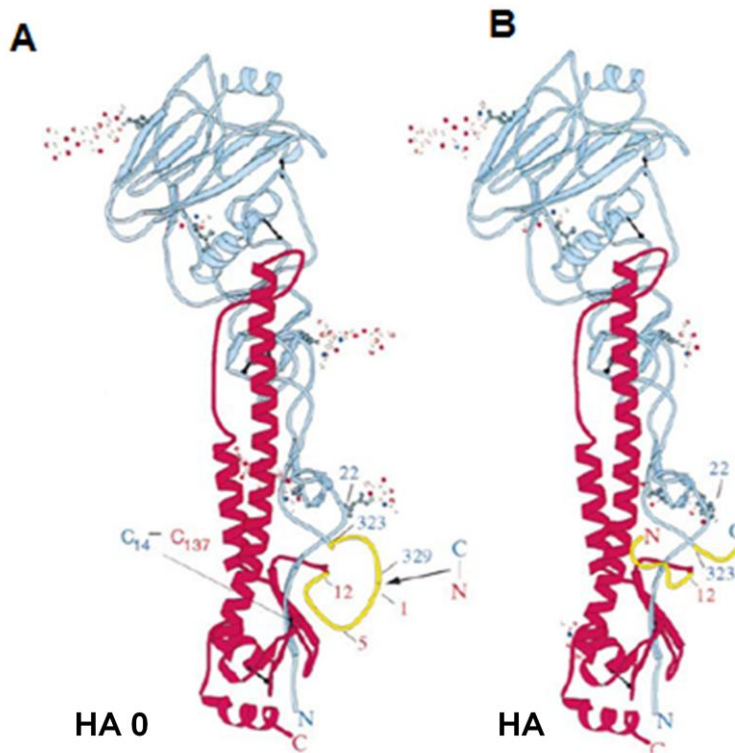
La cabeza se compone exclusivamente por la subunidad HA1 y contiene la cavidad o hendidura donde se da la unión al receptor, así como la mayoría de los sitios antigénicos de la molécula. El tallo está formado la subunidad HA2 y parte de HA1. <sup>(16)</sup> La región carboxi-terminal de HA2 contiene la secuencia transmembrana hidrofóbica y una terminal citoplasmática de anclaje secuencia donde el palmitato se adjunta. Debido a errores en la actividad de la ARN polimerasa viral, la HA del virus de la influenza es propensa a una tasa alta de mutación, la cual se estima en alrededor de  $2 \times 10^{-3}$  o cerca de una sustitución de bases en el gen HA por cada generación viral. <sup>(6)</sup> Las sustituciones de aminoácidos es impulsado en parte por la presión inmune ya que la HA es el principal objetivo en la respuesta inmune del huésped. Aunque los aminoácidos que componen el sitio de unión al receptor son altamente conservados, como la cisteína y la mayoría de los residuos de prolina, el resto de la molécula de HA es altamente mutable. <sup>(19)</sup> <sup>(20)</sup> En la naturaleza se han reconocido 16 subtipos de HA, que difieren al menos un 30% en la secuencia de aminoácidos de HA1 y serológicamente no tienen reacción cruzada. Los subtipos pueden incluir varias cepas variantes y estas pueden tener parcial reactividad cruzada. <sup>(6)</sup>

La HA al final del proceso consiste en una HA1 alrededor de 324 aminoácidos, además de un número de hidratos de carbono variables, y HA2 alrededor de 222 aminoácidos, más 3 residuos de palmitato. <sup>(14)</sup> <sup>(19)</sup>

Algunas cepas de virus de la influenza de mamíferos y aves causan infecciones anatómicas localizadas debido a que el rango de células secretoras de proteasas es limitado, dichas proteasas cortan extracelularmente el precursor HA0. Sin embargo, la HA0 de cepas de la influenza aviar altamente patógena son cortadas por una familia más amplia de proteasas intracelulares, resultando en infecciones sistémicas. Estas diferencias en patogenicidad se correlacionan con diferencias estructurales en el sitio de corte de la HA0, cepas patógenas tienen inserciones de

aminoácidos básicos en el sitio de corte u otras modificaciones en las secuencias en sus alrededores.<sup>(17)</sup>

Fig. 3 Estructura del precursor HA0



(A) Precursor HA0, sitio de corte (flecha). (B) Molécula HA después del corte. HA1 (azul), HA2 (rojo).

Chen J, Lee K H, Steinhauer D A, Stevens D J, Skehel J J, Wiley D C. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. (17)

Las proteasas responsables de cortar el precursor HA0 son secretadas por células del tracto respiratorio, una de ellas es producida por células Clara, conocida como triptasa, también las proteasas secretadas por *Mycoplasma* o tal vez son producidas en respuesta inflamatoria en infecciones.<sup>(17)</sup>

La HA del virus aviar de la influenza humana de Hong Kong en 1997, contenía cinco residuos de inserciones de aminoácidos básicos en el sitio de corte.<sup>(21)</sup> Estas inserciones se observan exclusivamente en las HA de los subtipos H5 y H7. La presencia de éstas inserciones se correlacionan con virulencia alta en aves de corral.<sup>(22)</sup> El corte, en estos casos, es intracelular. Las proteasas implicadas en

---

hacer el corte han sido identificadas como las enzimas furina y subtilisina. <sup>(21) (22)</sup> Estas enzimas intervienen en el procesamiento postraduccional de precursores de hormonas y factores de crecimiento del huésped. <sup>(16) (17)</sup>

Algunas cepas de H5 carecen del sitio de reconocimiento para la enzima furina, sin embargo siguen siendo altamente patógenas. Estos virus o bien carecen de un oligosacárido en la posición Asn-11 <sup>(23)</sup> o contienen sustituciones de aminoácidos básicos en P-5 y P-6. Esto podría influir en la accesibilidad de la proteasa en el punto de corte y perturbar la estructura de HA0 debido a que esos residuos no son expuestos, causando un aumento de la accesibilidad al sitio de corte. <sup>(17)</sup> Durante 1993 fueron aislados virus del subtipo H5N2 “non highly pathogenic” (nHP) de los pollos en Pennsylvania, Nueva York, Florida, <sup>(24)</sup> también fueron aislados de emús en Texas, <sup>(25)</sup> EUA, los cuales tenían una secuencia común que rodea el sitio de corte proteolítico. <sup>(24)</sup> Análisis parciales de secuencia de los aislamientos virales anteriormente mencionados, demostraron que dichas secuencias de corte estuvieron presentes en 1994 y 1995 durante los brotes de la influenza aviar altamente patógena en México. La adquisición de virulencia se correlacionó con una inserción arginina-lisina río arriba del sitio de corte. <sup>(23)</sup>

## SEGMENTO 5

Codifica para la Nucleoproteína. (NP). Es transportada hacia el núcleo de la célula infectada, donde se une y encapsida al ARN viral. <sup>(26)</sup> Además de su papel estructural, la NP juega un papel importante actuando como interruptor en la actividad de la ARN polimerasa viral para la síntesis de ARNm, cARN y vARN. La NP es sintetizada en las células infectadas y es la segunda proteína más abundante en el virión del virus de la influenza. La NP es también un objetivo importante de células T citotóxicas de la respuesta inmune del huésped. <sup>(13) (14) (26)</sup>

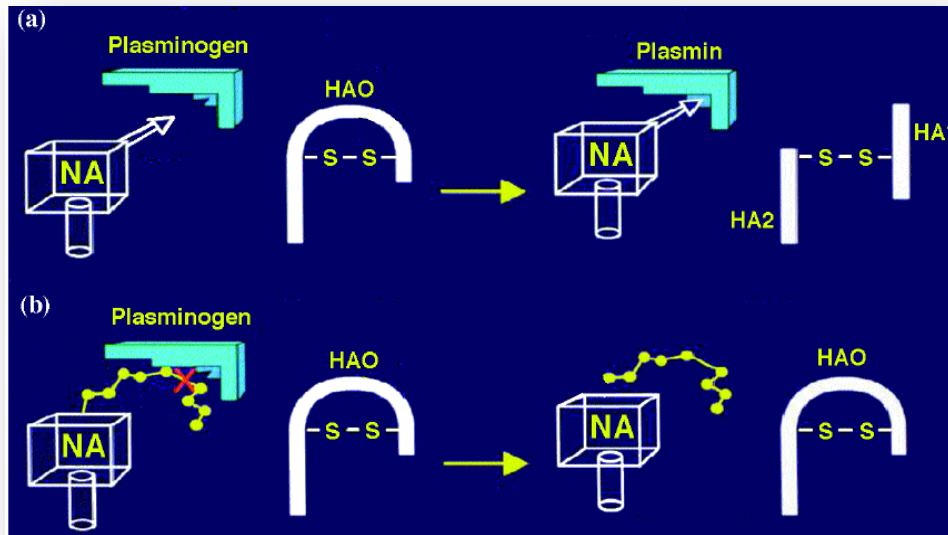
## SEGMENTO 6

Codifica para Neuraminidasa. (NA), también es una glicoproteína de membrana integral y el segundo antígeno mayor de superficie del virión. <sup>(13) (14) (27) (28)</sup> La NA funciona al final de cada ciclo del virus, facilitando la liberación de partículas

virales de las superficies celulares durante el proceso de gemación y ayuda a evitar la autoagregación de viriones, eliminando los residuos de ácido siálico de proteínas virales.<sup>(16) (22)</sup> La NA es glicosilada y posee una secuencia hidrofóbica aminoterminal cuyas funciones son servir como señal para el transporte del virión a la membrana celular y como dominio transmembrana.<sup>(13) (15) (26) (27) (29)</sup>

El corte de la molécula hemaglutinina (HA) por proteasas es un prerrequisito para la infectividad del virus de la influenza. La neuraminidasa, la segunda proteína importante en la superficie del virión, tiene una función inusual a la antes descrita, esta molécula se une y secuestra al plasminógeno, provocando un aumento local en la concentración de éste, el cual es un precursor inactivo de la enzima proteasa llamada plasmina, incrementando la posibilidad de que hayan cortes proteolíticos en la molécula de HA. La base estructural de esta función inusual parece ser la presencia de una lisina en la terminal carboxilo y/o la ausencia de una cadena lateral de oligosacáridos en la posición 146 de la NA. Estos hallazgos sugieren un medio por el cual los virus de la influenza A podrían llegar a ser altamente patógenos en humanos.<sup>(16) (30)</sup> Véase Fig. 4

Fig. 4 Representación esquemática de la activación del plasminógeno



Perdue M L, García M, Beck J, Swayne D E. An Arg-Lys insertion at the hemagglutinin cleavage site of an HSN2 avian influenza isolate. (25)

(a) El plasminógeno se une a la terminal carboxilo – lisina (flecha) de NA. El plasminógeno es activado a plasmina, posiblemente por enzimas celulares. La plasmina corta a HA0 y se generan dos subunidades, HA1 y HA2. (b) Cuando hay ausencia de lisina en la terminal carboxilo o es bloqueada por cadenas de aminoácidos adyacentes, la unión del plasminógeno es inhibida y no se generan los cortes proteolíticos en HA0.

## SEGMENTO 7

Es un gen bicistronico, codifica para 2 proteínas Matriz, éstas son M1 y M2. La proteína Matriz es la más abundante en el virión del virus de la influenza con una longitud de 1027 nucleótidos. <sup>(29)</sup> <sup>(31)</sup> La proteína matriz forma una capa que rodea la nucleocápside del virión, por debajo de la envoltura. En la célula infectada está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo. No se le conoce actividad enzimática, aunque se ha especulado que desempeña un papel importante en la iniciación del ensamblaje de la progenie viral. <sup>(6)</sup> <sup>(13)</sup> La proteína interna M1 (252 aminoácidos de longitud) es un componente importante de la partícula del virus, tiene un papel esencial en el ensamblaje y unión del virus. <sup>(31)</sup> <sup>(32)</sup>

La proteína M2 (97 aminoácidos de longitud) es una proteína asociada a la membrana con un papel definido en la replicación del virus <sup>(31)</sup> <sup>(32)</sup> y sirve como una señal para el transporte del virión a la superficie celular. Está presente como un tetrámero en grandes cantidades en la superficie de la célula infectada y una



pequeña cantidad se encuentra dentro del virión.<sup>(14)</sup> Actúa también como un canal de protones para controlar el pH del aparato de Golgi, durante la síntesis de la HA, esto con la finalidad de proteger la integridad estructural de la glicoproteína sensible a la acidez y permitir la acidificación en el interior del virión durante la pérdida de la envoltura viral.<sup>(31) (32) (33)</sup>

La evidencia disponible indica que los genes M son altamente conservados y se han mantenido estables durante el cambio antigénico de HA y NA.<sup>(33)</sup> Se han reportado varias sustituciones de aminoácidos en las proteínas M1 y M2 de virus humanos y aviáres, pudiendo así distinguir uno del otro. De lo contrario, hay poca información acerca de las relaciones evolutivas entre los genes M aislados de diferentes especies.<sup>(33) (34)</sup>

## SEGMENTO 8

Codifica para dos proteínas no estructurales NS1 y NS2. Estas proteínas, en particular NS1, son abundantes en las células infectadas (NS1 en el núcleo, NS2 en el citoplasma).<sup>(13) (14)</sup> El NS1 tiene numerosas funciones. Es un regulador del empalme del ARNm y en la traducción.<sup>(6)</sup> Las funciones de la proteína NS2 son la exportación de ribonucleoproteínas (RNPs) de nueva síntesis del núcleo hacia el citoplasma y, como tal, es también conocida como proteína de exportación nuclear (NEP).<sup>(12)</sup> Véase *Fig. 5*

## INFLUENZA A, B y C

Los virus de la Influenza del tipo A y B contienen ocho segmentos de ARN, mientras que el virus de la influenza tipo C contiene solo siete.<sup>(26), (35), (36)</sup> Las características generales estructurales y de organización del genoma de los virus de la Influenza A, B y C sugieren que comparten una ascendencia común y diferenciada de los virus ARN de cadena negativa. De los tres tipos de virus, los virus A y B son similares entre sí en la organización del genoma y la homología de proteínas, esto, en comparación a los virus C, (Véase **Fig. 6** y **Fig. 7**) lo que sugiere que los virus de la influenza C divergieron mucho antes de la división entre los virus A y B, esto se demuestra con análisis filogenéticos de los genes NP.<sup>(29), (37), (13)</sup> Por otro lado, se han comparado los genes de la polimerasa de los virus de

---

la influenza A y B y muestran un nivel alto de homología; la organización y el tamaño de estos genes se han mantenido similares. <sup>(6)</sup> Un análisis filogenético de secuencias parciales del gen HAI, del virus B/Lee/40 muestra una relación muy estrecha con la HA de los subtipos H9, H8, H12. Este análisis sugiere que alrededor de la divergencia de la HA de los virus de la influenza B, la HA de los subtipos de los subtipos H9, H8, H12 ya se habían separado también y que la HA de los 14 subtipos de la influenza se obtuvieron de estos subtipos ancestrales. <sup>(6)</sup> <sup>(29)</sup> Los virus de influenza B y C son virus humanos y no se han encontrado en huéspedes aviares, aunque el virus C se han aislado de los cerdos y los perros, lo que ha llevado a la sugerencia de que los cerdos sirven como un reservorio huésped alternativo para los virus B y C. <sup>(6)</sup>, <sup>(38)</sup> Los virus de la Influenza B y C presentan evolución más lenta (especialmente los virus del tipo C) en comparación con los virus de la Influenza A humana. <sup>(13)</sup>, <sup>(14)</sup>

Esta diferencia en la diversidad genética se refleja en el hecho de que la influenza tipo A se dividen en 16 subtipos de HA y nueve subtipos de (NA) y además pueden ser clasificados por cepas, mientras que los tipos B y C se clasifican solo por cepas. <sup>(39)</sup> Los subtipos de la HA se subdividen en dos grandes grupos basados en la similitud entre sus secuencias de aminoácidos. El grupo 1 incluye H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, y el grupo 2 incluye H3, H4, H7, H10, H14, H15. <sup>(40)</sup> <sup>(39)</sup> <sup>(41)</sup> Véase **Fig. 8** Los subtipos de la NA también se subdividen en dos grupos, el grupo 1 incluye a N1, N4, N5 y N8; y el grupo dos incluye a N2, N3, N6, N7 y N9. <sup>(22)</sup> Los virus de influenza B y C casi exclusivamente infectan a los humanos, causando enfermedades respiratorias leves, principalmente en niños. <sup>(6)</sup> Otros animales susceptibles a los tipos B y C son las focas, <sup>(42)</sup> hurones, <sup>(43)</sup> cerdos, <sup>(44)</sup> y perros. <sup>(45)</sup>

*Fig. 5 Segmentos de ARN del genoma del virus de la Influenza tipo A*

Segmento vARN	Longitud (pb)	Proteínas codificadas
1	2341	PB2
2	2341	PB1
3	2233	PA
4	1778	HA
5	1565	NP
6	1413	NA
7	1027	M1 y M2
8	890	NS1 y NS2

Tomado de: Cheung T K, Poon L L. Biology of influenza virus. Ann N Y Acad Sci. 2007 Apr;1102: 1-25. (14)

*Fig. 6 Comparación de los virus de la influenza A, B y C*

Características	Influenza A	Influenza B	Influenza C
Segmento Genómico	8	8	7
Glicoproteínas de superficie	HA y NA	HA y NA	HEF Hemaglutinina Esterasa de Fusión
Hospederos	Humano, cerdo, equino, felinos, ballenas, focas y aves	Humano y focas	Principalmente humano, pero también en cerdo

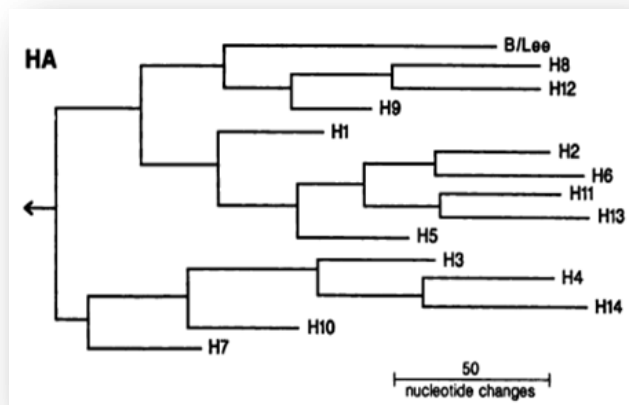
Tomado de: Gramer M R. Defining swine influenza virus. Journal of Swine Health and Production, 2005; 13(3):157-160. (13)

*Fig. 7 Similitudes entre las secuencias de los virus de Influenza A y B*

Gen	% Similitud	
	Nucleótidos	Aminoácidos
PB1	59.5-60.7	58.3-61
PB2	45.4-46.5	37-38
PA		38
HA	36-48	24-39
NA		
NP	33.6-35.5	37
M1	33	25
M2		14
NS	30	9.7-16.2

Tomado de: Webster R G, Bean WJ, Gorman O T, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. (6)

*Fig. 8 Análisis filogenético de secuencias del gen HA*



Tomado de: Webster R G, Bean WJ, Gorman O T, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992 Mar; 56(1):152-79. (6)

## DATOS DE EVOLUCIÓN GENÉTICA

Los estudios de evolución de los virus de la influenza A se basan principalmente en estudios filogenéticos de virus provenientes de humanos, con ello se ha generado un modelo de evolución, el cual dice que las proteínas de superficie viral evolucionan con mayor rapidez que las proteínas internas, esto debido a que la presión inmunológica es potencialmente alta. Para los virus de influenza humana, el gen de la proteína de superficie HA3 está evolucionando rápidamente, mucho más que los genes de proteínas internas como PB1 PB2, PA, NP y M1. Se puede apreciar la diferencia en la proporción de cambios silenciosos de nucleótidos en proteínas de superficie en comparación con los genes de proteínas internas. Entre las proteínas internas PB2, NP y M1, el porcentaje de cambios silenciosos es mucho mayor que en la proteína de superficie HA3 (81 a 96% frente a 57%, respectivamente). Véase *Cuadro 1* Además, la comparación de genes codificantes y no codificantes de los virus humanos, nos muestra que están evolucionando a un ritmo diferente. <sup>(6)</sup>

Cuadro 1 Datos evolutivos de los genes de la Influenza

Segmento Genómico	Tasas de evolución de nucleótidos ( $10^{-3}/\text{año}$ )			% cambios silenciosos	N <sup>b</sup>	Periodo
	Segmentos	Cambios de codificación	Cambios silenciosos			
Subtipo, Huésped						
PB1 (humano)	0.87				3	1957-1968
PB2 (humano)	1.82	0.15	1.67	92	7	1933-1988
PA (humano)	1.32				4	1934-1968
HA						
H3 <sup>c</sup> (humano)	7				16	1968-1979
H3 (humano)	4.44	1.91	2.53	57	14	1968-1986
H3 <sup>c</sup> (equino)	2.8				2	1963-1979
H3 (equino)	1.74	0.45	1.29	74	13	1963-1986
H1 <sup>c</sup> (humano)	4.3				14	1977-1983
H1 (humano)	0.61				5	1933-1980
H1 (cerdo)	1.26				9	1930-1988
NP (humano)	2.2				9	1934-1983
NP (humano)	2.18	0.42	1.76	81	16	1933-1983
NP (cerdo)	2.12	0.22	1.9	90	11	1930-1988
NP (aviar-cerdo)	2.88	0.47	2.7	83	3	1981-1989
NP (equino)	0.78	0.21	0.57	73	4	1963-1986
NP (aviar)	1.21	0	1.21	100	19	1927-1982
M (humano)	1.08				13	1933-1988
M1	0.83	0.03	0.8	96	13	1933-1988
M2	1.36	0.46	0.9	66	13	1933-1988
M (cerdo)	1.3				8	1933-1988
M1	1.43	0.05	1.38	97	8	1930-1988
M2	0.91	0.48	0.43	47	8	1930-1988
NS (humano)	1.94				9	1942-1985
NS (humano)	1.78				14	1933-1977

Webster R G, Bean WJ, Gorman O T, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992 Mar; 56(1):152-79. (6)

Para el virus H3N2 las tasas de evolución de virus de humanos son de (0.0122/sitio/año), en cerdos (0.0127/sitio/año) y en aves (0.0193/sitio/año), esto nos dice que los genes son similares, esto según las sustituciones sinónimas. En genes virales derivados de virus humanos y porcinos las sustituciones no

sinónimas se desarrollan alrededor de tres veces más rápido (0.0026-0.0027/sitio/año), en comparación con los virus aviares. (0.0008/sitio/año). Además, el mecanismo evolutivo por el cual los genes virales de H3 humanos y porcinos evolucionan a un ritmo similar, según las sustituciones no sinónimas, parece ser muy diferente de las pruebas anteriores, las que mostraron que la H1 de genes humanos evolucionan tres veces más rápido que las de los virus porcinos. La comparación del número de sustituciones no sinónimas en los sitios antigénicos (A-E) de moléculas de la hemaglutinina han demostrado que los virus porcinos evolucionan a un ritmo menor (hasta 5 veces menos) que los virus humanos, lo que refleja la naturaleza conservadora de la estructura antigénica en el primero. <sup>(46)</sup>

Por ejemplo los genes M1 y M2 del segmento M están evolucionando de manera muy diferente el uno del otro y encajan en el modelo de evolución de proteínas internos o externos que se acaban de mencionar. La proteína de superficie M2 tiene cambios mucho más rápidos que la proteína interna M1 y ésta alta proporción de cambios de nucleótidos en M2 son no silenciosos. La evolución en M1 es muy lenta y la acumulación de cambios de codificación es muy baja. <sup>(6) (31)</sup>  
Véase *Cuadro 2*

La tasa de sustitución de nucleótidos para la región codificante del gen de la NA de H3N2 fue de  $2.28 \times 10^{-3}$  /sitio/año (42% de mutaciones), similar a la región del tallo ( $2.58 \times 10^{-3}$ /sitio/año). La tasa de sustitución de aminoácidos en la región de NA fue de  $2.56 \times 10^{-3}$ /sitio/año. La tasa de sustitución de aminoácidos en el tallo de NA fue  $4.21 \times 10^{-3}$ /sitio/año, mayor que toda la región codificante. <sup>(28)</sup>

Genes homólogos a partir de cepas de virus específicos evolucionan a ritmos diferentes. Recientes estudios en el gen NP del virus de influenza aviar muestran tener una evolución más lenta que los virus humanos. Las proteínas de esos virus aviares son altamente conservadas, sin haber mostrado cambios en los últimos 60 años. Dentro de los virus aviares del viejo mundo, el gen NP no presenta cambios de codificación de aminoácidos, todos los cambios de nucleótidos se están acumulando en silencio. Genes NP del virus clásico porcino están evolucionando

de manera similar a los genes NP de virus humanos, pero a nivel de proteína los genes NP del virus clásico porcino están más conservados. Los genes de virus H3N8 equino, han venido evolucionado con mayor lentitud que los virus humanos o porcinos. <sup>(6) (47)</sup> Substituciones estimadas en los genes M y NS en  $5.4 \times 10^{-4}$  y  $5.1 \times 10^{-4}$ /por sitio/año respectivamente. <sup>(48)</sup>

Otro estudio mostró que en los genes HA, NP, M, y NS de cepas de H1N1 porcinos, los cambios codificantes y no codificantes son hasta de un 54% más altos que los virus clásicos porcinos y virus humanos. <sup>(49)</sup>

*Cuadro 2 Datos de evolución de los genes M y NS del virus de la influenza*

Huésped	Datos de evolución de nucleótidos Substituciones/sitio/año x $10^2$			Datos de evolución a nivel de proteína Substituciones/sitio/año x $10^3$		
	Gen M	Gen NS	Proteína M1	Proteína M2	Proteína NS 1	Proteína NS2
Equino	0.542	0.506	0.168	1.29	1.29	1.04
Humano	1.08	0.08	0.08	3.6	3.6	0.5
Cerdo	1.3	0.16	0.16	NA	NA	NA

Lindstrom S, Endo A, Sugita S, Pecoraro M, Hiromoto Y, Kamada M, Takahashi T, Nerome K. Phylogenetic analyses of the matrix and non-structural genes of equine influenza viruses. <sup>(48)</sup>

## INFLUENZA EN ANIMALES DOMÉSTICOS

Los virus de la influenza A infectan a una gran variedad de animales como cerdo, caballo, tigre, leopardo, perro, gato, ballena, foca, ave, civeta, camello. Y son experimentalmente susceptibles el hurón, hámster, ratón, primates no humanos como el macaco cynomolgus. <sup>(6) (27) (50) (51) (52) (53) (54) (55)</sup> La prevalencia de la transmisión de los virus de la influenza A depende de la especie animal. <sup>(6) (54) (55)</sup>

Además, se ha demostrado que las aves acuáticas son la fuente de todos los virus de la influenza de otras especies, <sup>(52) (56)</sup> presentando virus de la influenza de todos los 16 HA y 9 NA, <sup>(50) (51) (54)</sup> habiendo 144 posibles combinaciones, dividiéndose en 68 y 49 linajes y sublinajes de HA y NA respectivamente. <sup>(27)</sup> Los subtipos de la HA se subdividen en dos grandes grupos basados en la similitud entre sus secuencias de aminoácidos. El grupo 1 incluye H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16,



y el grupo 2 incluye H3, H4, H7, H10, H14, H15.<sup>(27) (40) (39) (41)</sup> Los subtipos de la NA también se subdividen en dos grupos, el grupo 1 incluye a N1, N4, N5 y N8; y el grupo dos incluye a N2, N3, N6, N7 y N9.<sup>(27) (22) (52)</sup> Como tales, proveen una gran reserva mundial de virus de la influenza en la naturaleza.<sup>(56)</sup>

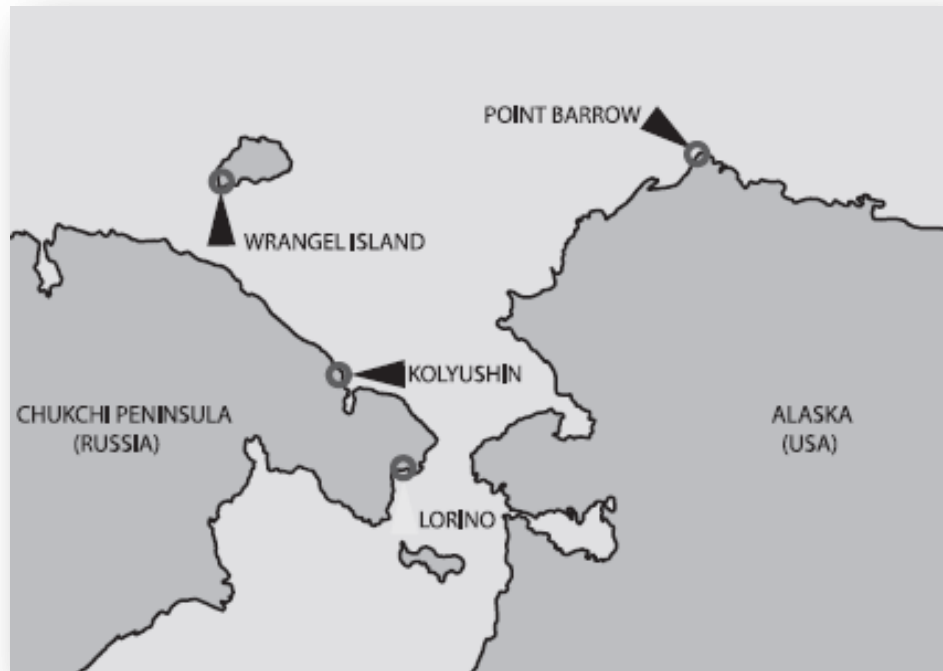
Los virus aviares son divididos en 2 grupos según su patogenicidad. Algunas formas de estos virus, se conocen como influenza aviar altamente patógena (HPAI), esta enfermedad es multisistémica y la tasa de mortalidad es cercana al 100%. Sin embargo, la mayoría de las cepas de estos virus son a virulentas, son conocidas como influenza aviar de baja patogenicidad (LPAI), la enfermedad es subclínica, produciendo infecciones leves en tracto respiratorio y gastrointestinal.<sup>(39) (51) (52)</sup> Estas cepas se aíslan comúnmente de muchas especies de aves silvestres, los hospederos naturales son particularmente las especies de Anseriformes (patos, cisnes y gansos) y Charadriiformes (gaviotas, charranes y limícolas).<sup>(52) (53)</sup>

Sin embargo los HPAI, no son mantenidos por las poblaciones de aves silvestres, ocasionalmente se han aislado de éstas aves y de aves terrestres, esto ocurre durante los brotes de enfermedad entre las aves de corral, durante dichos brotes se ha podido aislar un H5N3 letal en golondrinas de mar<sup>(57)</sup> y un H5N2 con genotipo HP en patos salvajes.<sup>(58)</sup> Esos virus HPAI se encontraron en los brotes de las aves de corral y fueron filogenéticamente relacionados con virus LPAI que estaban presentes en las aves acuáticas silvestres. En la actualidad, sólo los subtipos H5 y H7 (y en menor medida H9) son altamente patógenos.<sup>(52) (59)</sup>

Existen dos linajes de virus aviares, linajes Eurasiáticos y linajes de América del Norte.<sup>(60) (61) (62)</sup> La región del estrecho de Bering ha servido como una vía de dispersión de virus aviares entre Eurasia y América del Norte a través de las aves migratorias y aves acuáticas que anidan en esta región. Véase *Fig. 9* Las aves acuáticas migratorias y aves costeras de esta región siguen dos rutas principales: o bien a lo largo de la costa oeste de Estados Unidos (para algunas especies

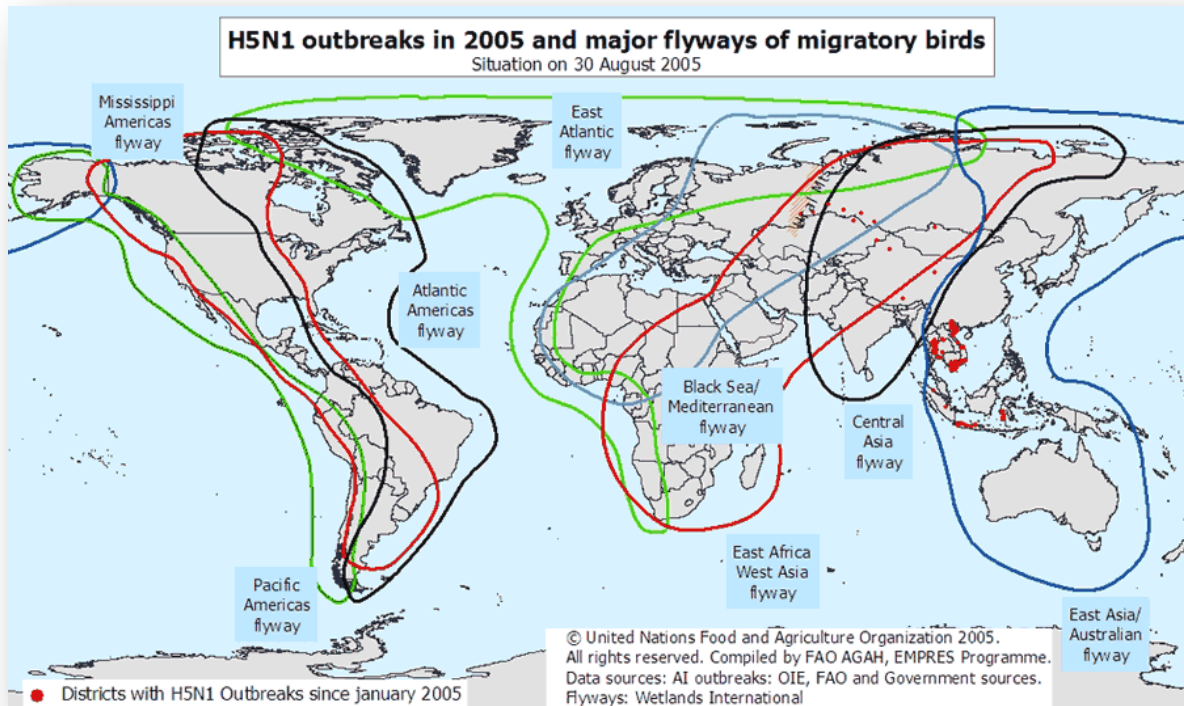
hasta a América del Sur) o, a lo largo de la ruta migratoria de Australasia para el sudeste asiático y Australia. <sup>(60)</sup> Véase *Fig. 10*

*Fig. 9 Mapa de la región del estrecho de Bering*



Tomado de: Wahlgren J *et al.* Gene segment reassortment between American and Asian lineages of avian influenza virus from waterfowl in the Beringia area. (60)

Fig. 10 Rutas de aves migratorias



<http://www.generationaldynamics.com/cgi-bin/D.PL?xct=gd.e060303> (02-08-11, 09:52 a.m.) (63)

## HISTORIA DE LA INFLUENZA EN EL CERDO

La influenza se reconoció por primera vez en los cerdos en los Estados Unidos en 1918, dicho virus fue aislado en 1930 por Richard Shope.<sup>(64)</sup> Estos virus fueron los progenitores de lo que hoy conocemos como el H1N1 clásico.<sup>(56)</sup>

En cerdos, la recombinación entre virus H3N2 y virus H1N1 clásico llevó a la aparición de los virus H1N2. Surgiendo y distribuyéndose en poblaciones de cerdos en los EUA a partir de 1999. Este H1N2 contenía genes de la Influenza A humana, aviar y porcina. Los virus H1N2 no solo habían sido aislados en EUA sino también, en años anteriores se reportaron en Japón en 1978, en Francia en 1987, en el Reino Unido desde 1994 y en Bélgica en 1999.<sup>(50)</sup>

Desde 1998, han surgido en Estados Unidos y Canadá algunas recombinantes del virus de la influenza porcina. Una de ellas es la doble recombinante del subtipo

---

H3N2, que contiene genes de origen humano y porcino. Otra, es la triple recombinante (porcino / aviar / humano, subtipos H3N2, H1N2, H1N1 y H3N1).<sup>(65)</sup> En China han surgido en los cerdos un H3N2 doble recombinante que contiene genes humanos (HA y NA) y genes aviares (PB2, PB1, PA, NP, M y NS) y el virus H3N2 triple recombinante contiene genes humanos (HA y NA), un gen de origen porcino (NP) y genes de origen aviar (PB2, PB1, PA, M y NS).<sup>(65)</sup>

Durante la década de 1970 la población porcina en Europa se convirtió en hospedero de un nuevo virus H1N1 aviar. Este virus fue antigénicamente y genéticamente distinto del virus H1N1 clásico, el cual era descendiente directo del virus de 1918. En los años siguientes, el nuevo virus aviar reemplazó al H1N1 clásico y continuó evolucionando mediante la recombinación con otros virus de cerdos y virus humanos. Otro nuevo linaje del virus ha aparecido recientemente en los cerdos en los Estados Unidos. A finales de 1990, genes de virus humanos y aviares se introdujeron en el pool genético de virus porcinos. En estos virus se identificaron los genes de la HA, NA y PB1 de origen humano, los genes de la NP, NS y M de origen porcino y los genes PA y PB2 de origen aviar, estableciéndose rápidamente en los cerdos de América del Norte; además se continúa dando la redistribución del virus H1N1 clásico porcino. *Fig. 11*

*Fig. 11 Fenotipos del virus de influenza que infectan a los cerdos alrededor del mundo*

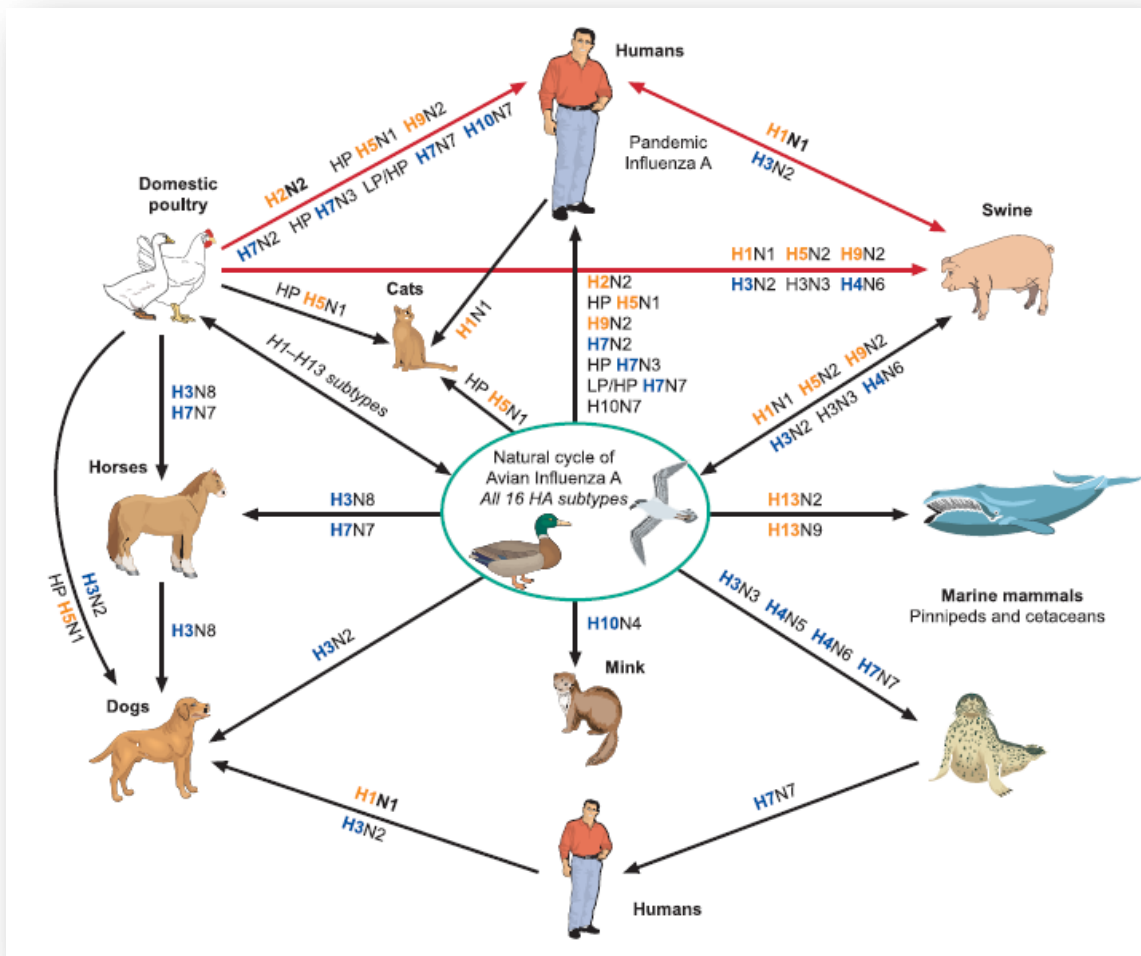
Subtipo	Área Geográfica	Comentarios
H1N1	Norteamérica	Virus Clásico aislado en 1930 en Norteamérica
	Europa	
	Asia	
	Sudamérica	
H3N2	Europa	Virus Aviar aislado en 1970
	Asia	Virus Aviar aislado en 1993
	Asia	Virus Humano aislado en 1970 en Asia
	Europa	
H1N2	Norteamérica	Virus Aviar aislado en 1978
	Sudamérica	
	África	Virus Recombinante: Virus Clásico/Virus Humano en Japón
	Asia	
H1N2	Europa	Virus Recombinante de virus Humanos en Gran Bretaña

Tomado de: Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. (66)

## SUBTIPOS AISLADOS DEL CERDO

Históricamente, un número limitado de subtipos virales han sido aislados rutinariamente de cada especie de mamíferos, por ejemplo, H2N2, H1N1 y H3N2 en el humano, H3N8 y H7N7 de los caballos y H1N1, H3N2 y H1N2 de los cerdos. <sup>(56)</sup> <sup>(59)</sup> Véase *Fig. 12* En varias regiones del mundo se han aislado del cerdo otros subtipos de Influenza tipo A, esto de forma esporádica, sin llegar a ser establecidos.

Fig. 12 Representación esquemática de las especies afectadas por los virus de la influenza



Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. (39)

## H1N7

En gran Bretaña en 1992 Brown IH *et al.*, describen el aislamiento de este virus proveniente del cerdo. El H1N7 (A/swine/Eng/195852/92) se compone de seis genes del H1N1 humano (A/USSR/90/77), el cual circuló en la población humana a finales de 1970 y dos genes (NA y M) derivados de un virus equino A/equine/Prague/1/56 (H7N7) que no había sido aislado de los caballos desde 1980. <sup>(66) (67)</sup>

## H9N2

El subtipo H9N2 es un miembro notable de los virus de la influenza A, esto se debe a que no solo puede infectar a los pollos, patos y al cerdo, sino también al humano. En China en el año de 1992 se aisló éste subtipo de aves de corral en la provincia de Guangdong (Chen *et al.*, 1994) y actualmente es el subtipo viral más frecuente en esa región. <sup>(59)</sup> <sup>(68)</sup> Este virus H9N2 causa una importante morbilidad y mortalidad en cerdos. Los ocho genes de este virus H9N2 proveniente de cerdos mostraron alta homología con A/Pigeon/Nanchang/2-0461/00 y con A/Wild Duck/Nanchang/2-0480/00. <sup>(59)</sup> Análisis filogenéticos de los genes internos mostraron que este virus H9N2 porcino está estrechamente relacionado con los subtipos H3, H4, H5, H7, H10 y H14. <sup>(69)</sup> En el estudio descrito por Cong *et al.*, describieron cinco aislamientos virales en el que los genes de la NP de H9N2 están estrechamente relacionados con el virus H5N1 que circulan actualmente en China. Estos resultados indican que los virus H9N2 “recientes” son resultado de la recombinación entre H9 y H5. <sup>(68)</sup>

## H4N6

En Canadá en 1999 y en EUA en el 2002 Alexander I *et al.*, reportan el aislamiento de un virus H4N6 proveniente de cerdos. <sup>(56)</sup> <sup>(70)</sup> <sup>(71)</sup> Análisis de secuencia de los segmentos genómicos revelaron que se tratan de virus aviares de linaje americano. <sup>(70)</sup> Las glicoproteínas virales de superficie H4 y/o N6 se encuentran entre los virus más comunes de la influenza en las poblaciones de patos canadienses. El nivel de diseminación es muy alto, ya que estos virus de influenza han sido aislados directamente de agua de los lagos. <sup>(56)</sup>

## H3N3

Karasin A *et al.*, realizaron un estudio en el 2001 y 2002 del cual reportaron el aislamiento del subtipo H3N3 proveniente de cerdos en Canadá. Ese virus estaba filogenéticamente relacionado con virus de aves acuáticas y era antigénicamente distinto de los virus circulantes en las poblaciones porcinas de Norteamérica. <sup>(71)</sup>

---

### H3N8

En China en los años de 2004 al 2006, Tu J *et al.*, obtuvieron dos aislamientos del virus H3N8 provenientes de cerdos A/swine/Chibi/01/2005 (H3N8), A/swine/Anhui/01/2006 (H3N8). Análisis filogenéticos y de secuencia de los ocho segmentos genéticos revelaron que los dos aislamientos porcinos fueron de origen equino, estrechamente relacionados con los virus H3N8 de la influenza equina europea de principios de los años 90's. Al comparar las secuencias de aminoácidos de la hemaglutinina (HA), mostró varias sustituciones importantes. Una de esas sustituciones causó la pérdida de un sitio del potencial de glicosilación. Otras dos sustituciones encontradas se localizaban en el sitio de corte y otra adyacente al sitio de unión al receptor, <sup>(72)</sup> estas sustituciones habían sido reportadas previamente en una H3 de origen canino en los EUA en donde la transmisión era de tipo horizontal (perro-perro). <sup>(73)</sup>

### H3N1

Recientemente, el aislamiento de un nuevo virus de la influenza porcina H3N1 fue reportado en Taiwán, Corea y EUA. Este subtipo viral no se había reportado previamente en Europa, sin embargo en Italia en el 2006, Moreno A *et al.*, describe el aislamiento de un virus de influenza H3N1 proveniente de cerdos. La tipificación antigénica y la caracterización genética sugiere que el nuevo aislamiento fue una recombinación entre el virus H1N1 y H3N2 circulantes en Italia. <sup>(74) (75) (76)</sup>

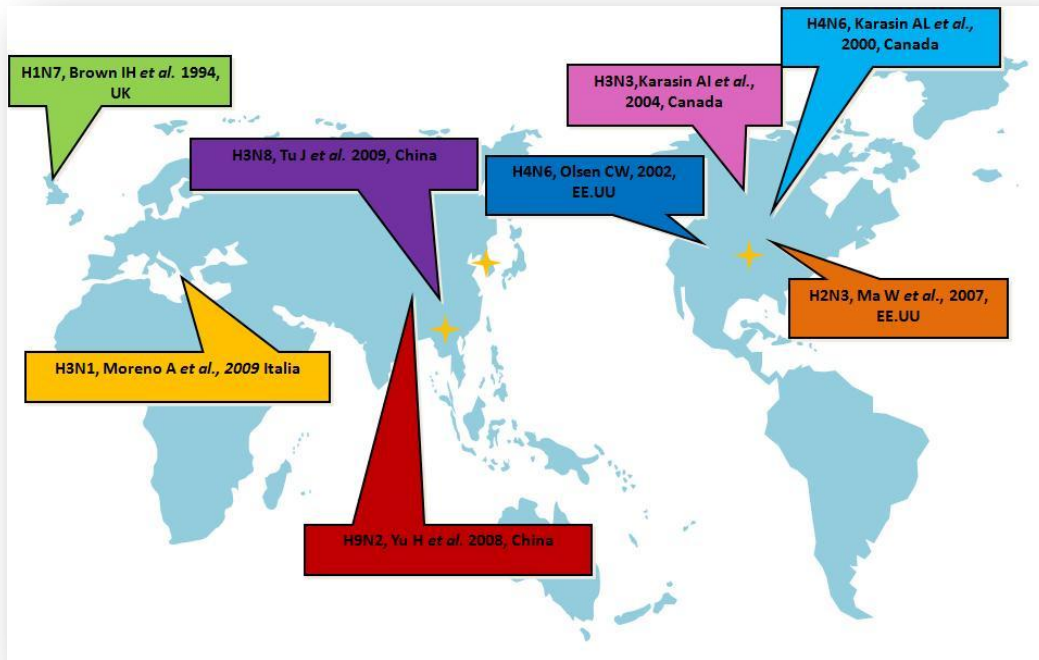
### H2N3

En Estados Unidos en el 2006 se reportó el aislamiento y caracterización de un virus H2N3, el cual no se había reportado previamente en cerdos. Se observó que este virus H2N3 contenía genes derivados del virus de la influenza aviar e influenza porcina. En la actualidad existen dos linajes de los virus de la influenza aviar H2, el linaje euroasiático tiene mayor similitud genética a los virus humanos H2 que al linaje americano. Sin embargo, algunos virus H2 aislados de aves costeras de América del Norte contienen la HA del linaje Eurasiático, lo que



sugiere que la transmisión interregional de genes del subtipo H2 están circulando en las aves, especialmente en aves migratorias.<sup>(77) (78)</sup> Véase Fig. 13

Fig. 13 Mapa de subtipos aislados del cerdo



## HISTORIA DE LA INFLUENZA TIPO A EN HUMANOS

La influenza es sólo una de las más de 200 enfermedades infecciosas que se transmiten entre humanos y animales. Teniendo en cuenta el incremento del 30% de las nuevas enfermedades zoonóticas en el último tercio del siglo XX, es muy posible que el VIH / SIDA, Ébola / Marburg, virus Zaire, virus del Nilo Occidental, virus del SARS o algún otro nuevo agente patógeno sean planteados como una amenaza mayor que la influenza, ya sea en los humanos o en animales. Sin embargo, la presencia de un alto número de reservorios del virus de la influenza aviar indica que la amenaza de la influenza es muy importante, y que la salud humana y animal deben ser vistas en una red integrada y multidisciplinaria.<sup>(65)</sup>

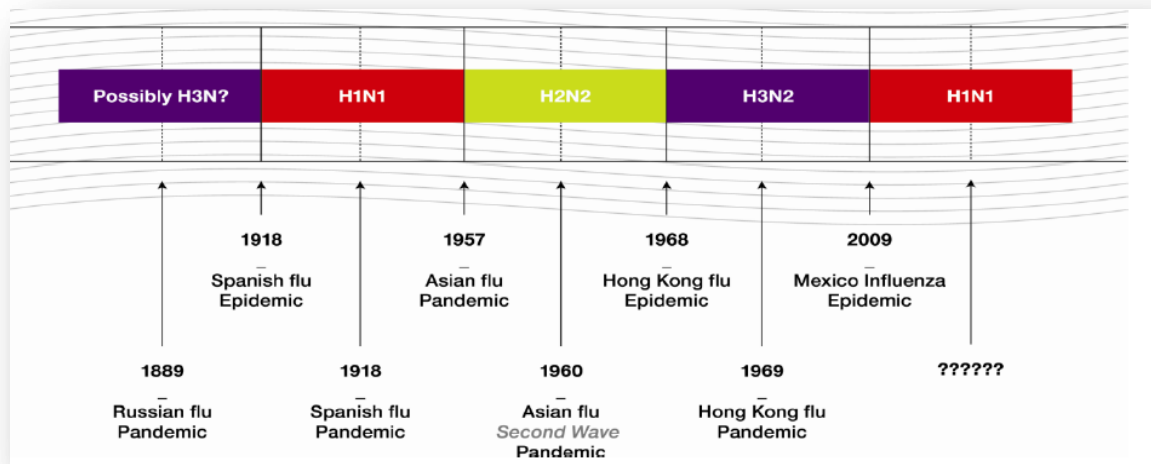
La historia de las pandemias de influenza humana ofrece información importante para futuros eventos. El primer brote documentado es la descripción de la

---

pandemia ocurrida en 1580 originándose en Asia y distribuyéndose a Europa, África y América. <sup>(79)</sup> En el siglo XVIII existieron pandemias significativas en los años 1729, 1732 y 1781. <sup>(65)</sup> En el siglo XIX se describieron varias pandemias conocidas también como la “gripe Rusa” teniendo origen en el Oeste de Europa, las cuales se presentaron en los años 1800-1801, 1837, 1843, 1857, 1874 y 1889-92. <sup>(79)</sup> En el siglo XX se conocen pandemias como la del año de 1918, 1977 y 2009 causadas por el subtipo H1N1. <sup>(71) (74) (75) (76)</sup> Véase *Fig. 14*

La epidemiología molecular sugiere que la pandemia de influenza de 1918 fue causada por un virus de la influenza aviar H1N1. <sup>(74)</sup> En 1957 la “gripe asiática” (H2N2), 1968 la “gripe de Hong Kong” (H3N2), el brote de influenza en 1976 en Fort Dix, Nueva Jersey por el H1N1 porcino, la reintroducción en Rusia del virus H1N1 en 1977 y en 1997 en Hong Kong el subtipo emergente H5N1 HPAIV. <sup>(65) (75) (76)</sup>

Fig. 14 Historia esquematizada de las Pandemias de la Influenza tipo A



Tomado de: Tognotti E. Influenza pandemics: a historical retrospect. (79)

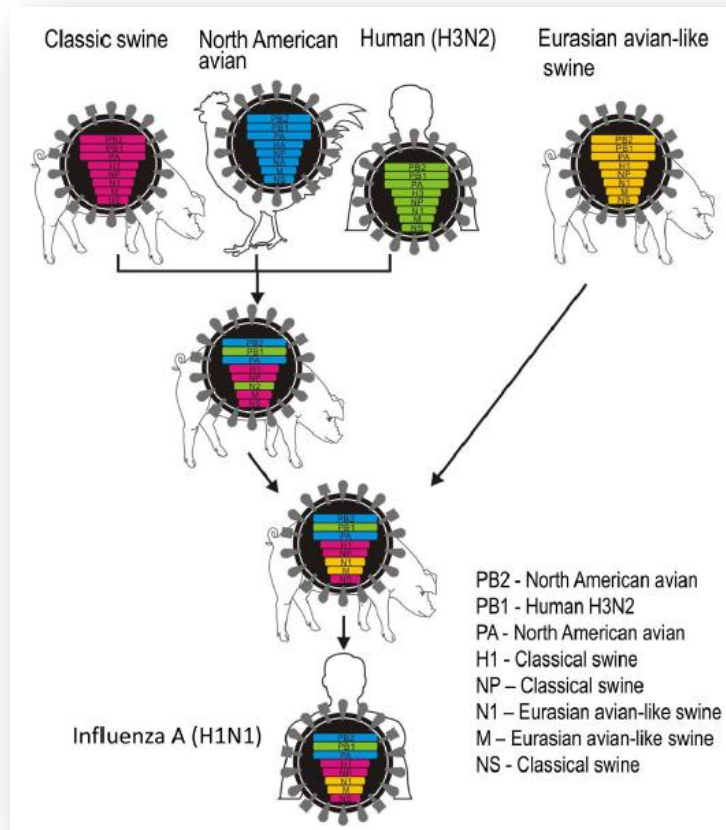
## INFLUENZA H1N1 2009

En Abril del 2009, emergió una nueva variante del virus de influenza H1N1 la cual fue llamada H1N1 pandémica (pH1N1), causando la primera pandemia del siglo XXI. <sup>(80) (81) (82) (83)</sup> Esta variante fue reportada en México, Canadá, EU, Guatemala, Argentina, Chile, Perú, Australia, Nueva Zelanda, UK, Holanda, Taiwán, Nepal y en otras partes del mundo. <sup>(83) (84) (85)</sup>

Este virus pandémico es una triple recombinante, el cual contiene genes de origen aviar, cerdo y humano. <sup>(84) (86)</sup> Está relacionado genéticamente con la triple recombinante de influenza H1N1 de origen porcino que había venido circulando en América, con excepción de los genes NA y M, los que derivan del virus de influenza de origen porcino de Europa y Asia. Los segmentos PB2, PB1, PA, HA, NP y NS están estrechamente relacionados a los virus porcinos H1N2 y H3N2 aislados en Norteamérica. <sup>(87) (88) (89)</sup> Véase Fig. 15

Aunque el virus pH1N1 es altamente transmisible entre los seres humanos, las infecciones se caracterizaron en su mayoría con síntomas leves. Esto se asocia con la ausencia de marcadores de virulencia identificados previamente en cepas de virus de origen humano y aviar. <sup>(80) (86)</sup>

Fig. 15 Origen del virus pandémico A H1N1



Tomado de Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature. (88)

Análisis de secuencia de los ocho segmentos genómicos de tres aislados provenientes de México (A/México/InDRE/4487/2009), presentaron homología con otros aislamientos del pH1N1 proveniente de humanos y porcinos.<sup>(82) (90)</sup> Lo que lo hacía antigénicamente distinto al virus estacional humano de la Influenza tipo A, esto se correlaciona con deficiencia en la inmunidad protectora hacia el pH1N1 en personas nacidas después de 1957 presumiblemente por falta de exposición a cepas de H1N1 que ya no se distribuyeron después de ese tiempo.<sup>(82) (90)</sup> Véase Cuadro 3

Cuadro 3 Datos de origen del pH1N1

Segmento	Similitud	Años
PB2	Cerdo, Norteamérica	1998-2007
PB1	Cerdo, Norteamérica	1998-2007
PA	Cerdo, Norteamérica	1998-2007
HA	H1 Cerdo, Norteamérica	1985-2007
NP	Cerdo, Norteamérica	1985-2007
NA	Aviar/Cerdo, N1 Eurasia	1982-2007
M	Cerdo, Eurasia	1980-2005
NS	Cerdo, Norteamérica	1998-2007

Solovyov A, Palacios G, Briese T, Lipkin WI, Rabadan R. Cluster analysis of the origins of the new influenza A(H1N1) virus. (87)

La secuenciación de fragmentos parciales de los genes HA y NA del virus pH1N1 2009, no mostraron presencia de mutaciones en los sitios de resistencia a antivirales (H275Y, R293 o N295), pero se encontraron cinco nuevas variantes en la NA y 4 en la HA del pH1N1. <sup>(91)</sup>

La acción inmediata para mitigar los efectos clínicos y sociales fueron tomadas por varias ciudades, esto incluyó la vigilancia de probables casos de influenza pH1N1, detección de personas con fiebre en aeropuertos, confirmación de los casos por laboratorios, cuarentena y terapia antiviral en casos probables. <sup>(83)</sup> Algunos estudios mostraron diferencias importantes en la signología presente entre la influenza estacional y la pandémica, el rango de edad de los casos descritos fueron los jóvenes, un factor nuevo fue la obesidad y síntomas que antes no habían sido reportados como frecuentes ni asociados con la infección por influenza como diarrea y vomito. <sup>(84) (92)</sup>

---

En México las acciones del Gobierno además de las mencionadas anteriormente, incluyeron el cierre obligatorio de escuelas, negocios y servicios en todo el país para identificar, aislar y tratar a las personas con signología sugerente al de la influenza. San Luis Potosí fue el estado con mayor número de casos y el de menor fue Querétaro. <sup>(93)</sup>

Por otro lado, el pH1N1 no solo afectó al humano, otro estudio demostró que los pavos son susceptibles a este virus pH1N1 humano. <sup>(82)</sup> El primer reporte que se tuvo de mascotas infectadas con el virus pH1N1 fue de hurones seguido por gatos domésticos, en EU. <sup>(94)</sup>

## DESVIACIÓN ANTIGÉNICA

Los dos antígenos de superficie de virus de influenza, experimentan alteraciones en forma independiente. Las alteraciones antigénicas menores se denominan desviaciones antigénicas. La desviación antigénica se debe a la acumulación de mutaciones puntuales en el gen, que resultan en cambios de aminoácidos en la proteína. Los cambios en la secuencia de aminoácidos, pueden alterar los sitios antigénicos sobre la molécula, de modo que es posible que el virión escape al reconocimiento por el sistema inmune del huésped. Una variante debe experimentar dos o más mutaciones antes de que surja una cepa nueva con importancia epidemiológica. <sup>(16)</sup> Véase *Cuadro 4*

## CAMBIO ANTIGÉNICO

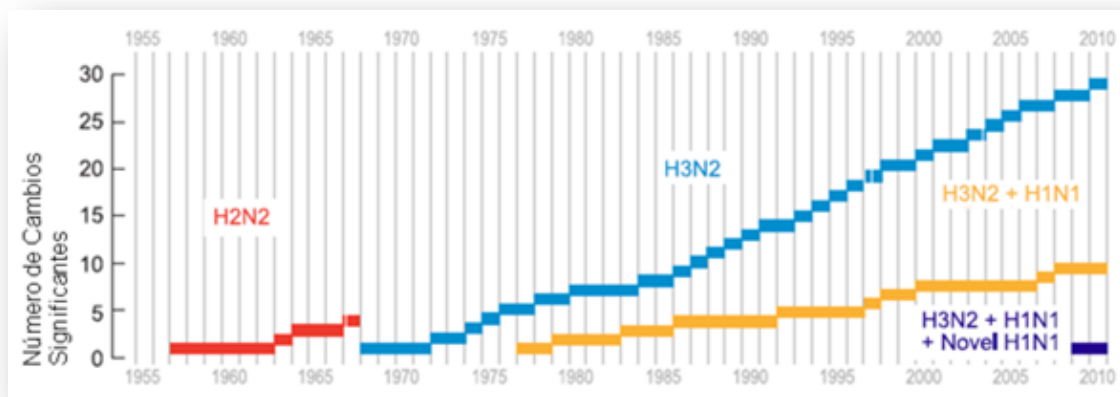
Las alteraciones antigénicas importantes en HA o NA, llamadas cambios antigénicos, conducen a la aparición de un subtipo nuevo. El cambio antigénico refleja alteraciones drásticas en la secuencia de una proteína de la superficie viral; cambios demasiado grandes para ser considerados como una mutación. Los segmentos genómicos virales de influenza, se redistribuyen con facilidad en las células doblemente infectadas. <sup>(16)</sup>

Un mecanismo probable para el cambio antigénico es el entrecruzamiento o reordenamiento genético entre virus de influenza humanos y no humanos, en

especial los de origen aviario. Los virus de influenza B y C no muestran cambio antigénico, quizás debido a que existen pocos virus semejantes en los animales. (19)

Los tres tipos de virus de influenza muestran desviación antigénica. Sin embargo, solo el tipo A experimenta cambio antigénico, posiblemente debido a que los tipos B y C están restringidos al hombre, en tanto que los virus relacionados a la influenza tipo A circulan en poblaciones de mamíferos y aves. (22)

*Cuadro 4 Cambios Antigénicos significantes por año*



Modificado de: Morens DM. The 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus: What Next? (81)

## REPLICACIÓN DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA

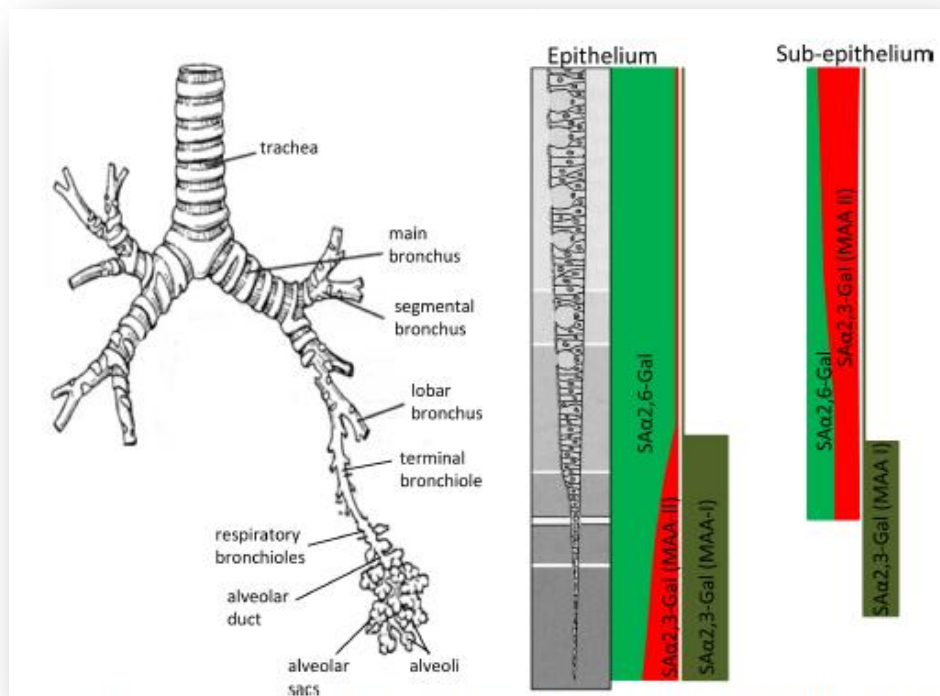
Las primeras etapas de infección por el virus de la influenza inicia con la HA, mediante la unión al receptor y la fusión de membranas. Los receptores que reconocen son el ácido siálico y glicolípidos de glicoproteínas de la superficie celular. (16)

El rango de huéspedes de los virus de la influenza se asocia con diferentes aminoácidos dentro y alrededor del sitio de unión al receptor de la HA. (16) (19) Los virus de la Influenza aviar se unen a receptores con enlace  $\alpha$  2,3 de ácido N-acetilneuramínico galactosa (NAc  $\alpha$  2,3 Gal), los cuales se encuentran principalmente en células intestinales de aves. El epitelio respiratorio de perros y equinos también expresan estos receptores.

Los virus de la influenza humana y el epitelio del tracto respiratorio superior de gatos se unen a receptores con enlace  $\alpha$  2,6 de ácido N-acetilneuramínico galactosa (NAc  $\alpha$  2,6 Gal), presentes en células epiteliales traqueales humanas. (59) (71) (74) (95) Véase Fig. 16

Los cerdos expresan ambos receptores NAc  $\alpha$  2,3 Gal y NAc  $\alpha$  2,6 Gal, por lo que pueden actuar como hospederos intermediarios en donde los virus de la Influenza humana y aviar podrían replicarse. (71) (96)

Fig. 16 Representación esquemática de receptores de NAc  $\alpha$  2,3 Gal y NAc  $\alpha$  2,6 Gal en el cerdo



Tomado de: Nelli RK *et al.* Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. (86)

Kida *et al.*, demostraron que los cerdos pueden ser infectados experimentalmente con casi todos los subtipos aviáres (H1-H13) y pueden ser susceptibles a los subtipos H14-H16. (65) (86) (96)

La HA juega un papel muy importante en la patogénesis de la influenza. El corte de la molécula hemaglutinina (HA) por proteasas es un prerrequisito para la infectividad del virus, una de ellas es producida por células Clara, conocida como



triptasa, o las proteasas secretadas por *Mycoplasma*. También se han identificado proteasas intracelulares como las enzimas furina y subtilisina. <sup>(22)</sup> <sup>(21)</sup> Estas enzimas intervienen en el procesamiento postraducciona l de precursores de hormonas y factores de crecimiento del huésped. <sup>(16)</sup> <sup>(17)</sup> Esto resulta en la formación de dos subunidades llamadas HA1 y HA2, eliminando así los residuos de arginina, lo que los separa del precursor. <sup>(16)</sup> <sup>(17)</sup> La terminal amino de HA2 recién formada tiene una secuencia no polar llamada péptido de fusión. El corte es esencial para la infectividad del virus, su potencial es activado cuando la HA es inducida a pH bajo por endosomas, lo que conduce a cambios conformacionales irreversibles en la molécula. Estos cambios son requeridos para la entrada del virus a la célula. Los cambios conformacionales y el corte extracelular se correlacionan con la patogenicidad del virus. <sup>(17)</sup> <sup>(18)</sup>

La HA sufre tres tipos de procesamiento postraducciona l: división proteolítica, glicosilación y acilación de ácidos grasos. Nuevos sintetizados de HA se escinden para eliminar la secuencia hidrofóbica amino-terminal de 14 a 18 aminoácidos, la cual es la secuencia señal para el transporte a la membrana celular. <sup>(6)</sup> Cadenas de hidratos de carbono secundarios se añaden, cuyo número y posición varía dependiendo la cepa del virus. El ácido palmítico se agrega a los residuos de cisteína, cerca de la terminal HA carboxilo. El paso final es el corte de la HA0 en dos subunidades, HA1 y HA2 que están unidos por enlaces disulfuro. <sup>(16)</sup>

Posteriormente el complejo proteínico viral de la polimerasa reconoce la estructura 5' de los ARNm de la célula huésped para posteriormente unirse a él durante el inicio de la transcripción del ARNm viral. Las proteínas recién sintetizadas por PB2 migran al núcleo de las células infectadas. <sup>(13)</sup> <sup>(6)</sup> <sup>(14)</sup> <sup>(15)</sup> La polimerasa PB1, es la proteína responsable de la elongación del ARNm viral que recién migró al núcleo, también como proteína de elongación de la plantilla de ARN y síntesis ARN viral. La proteína PB1 se localiza en el núcleo de las células infectadas. <sup>(6)</sup> <sup>(14)</sup>

La nucleoproteína es transportada hacia el núcleo de la célula infectada, donde se une y encapsida al ARN viral. <sup>(26)</sup> Además de su papel estructural, la NP juega un

---

papel importante actuando como interruptor en la actividad de la ARN polimerasa viral para la síntesis de mARN, cARN y vARN.<sup>(13) (14) (26)</sup>

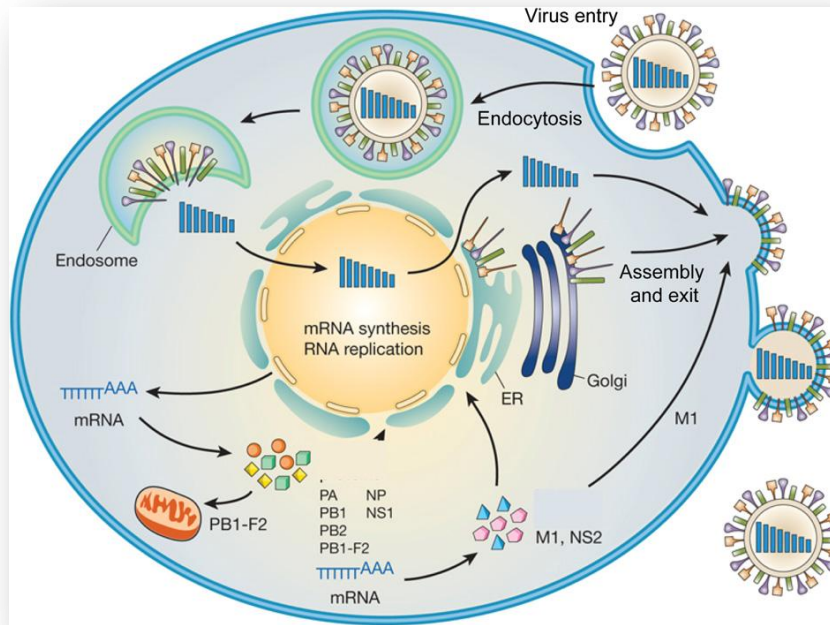
Las proteínas no estructurales NS1 regulan el empalme del ARNm y participan en la traducción.<sup>(6)</sup> Las funciones de la proteína NS2 son la exportación de ribonucleoproteínas (RNPs) de nueva síntesis del núcleo hacia el citoplasma y, como tal, es también conocida como proteína de exportación nuclear (NEP).<sup>(12)</sup>

La proteína matriz forma una capa que rodea la nucleocápside del virión, por debajo de la envoltura. Esta proteína desempeña un papel importante en la iniciación del ensamblaje de la progenie viral.<sup>(13) (6) (31) (32)</sup> Sirve como señal para el transporte del virión a la superficie celular. Actúa también como un canal de protones para controlar el pH del aparato de Golgi, durante la síntesis de la HA, esto con la finalidad de proteger la integridad estructural de la glicoproteína sensible a la acidez y permitir la acidificación en el interior del virión durante la pérdida de la envoltura viral.<sup>(31) (32) (33)</sup>

La neuraminidasa, la segunda proteína importante en la superficie del virión, funciona al final de cada ciclo del virus, facilitando la liberación de partículas virales de las superficies celulares durante el proceso de gemación y ayuda a evitar la autoagregación de viriones, eliminando los residuos de ácido siálico de proteínas virales.<sup>(16) (22)</sup> La NA también se une y secuestra al plasminógeno, provocando un aumento local en la concentración de éste, el cual es un precursor inactivo de la enzima proteasa llamada plasmina, incrementando la posibilidad de que haya cortes proteolíticos en la molécula de HA. La base estructural de esta función inusual parece ser la presencia de una lisina en la terminal carboxilo y/o la ausencia de una cadena lateral de oligosacáridos en la posición 146 de la NA.<sup>(16)</sup>  
<sup>(30)</sup> La infectividad del virus depende del corte de la HA por proteasas específicas, mientras que NA está involucrada en la liberación de los viriones progenie de la superficie celular y previene el agrupamiento de los virus recién formados.<sup>(16)</sup>

Véase *Fig. 17*

Fig. 17 Replicación de los virus de influenza



Tomado de: Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Río M de L, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). (97)

## VARIANTES

Una variante viral es la adaptación o modificación que sufren algunos virus a la presión inmune y/o a fármacos antivirales, esto mediante la sustitución de aminoácidos en sitios antigénicos (comúnmente en HA y NA). Por ejemplo, podemos encontrar variantes con mutaciones consecutivas en proteínas de superficie las cuales son reconocidas por anticuerpos previamente formados o también por linfocitos T. Esto permite que el virus escape a la neutralización de los anticuerpos generados previamente, también puede modificar la especificidad de unión al receptor. <sup>(98) (99)</sup>

## MODIFICACIÓN DEL RECEPTOR

La HA del virus de la influenza es propensa a una tasa alta de mutación, la cual se estima en alrededor de  $2 \times 10^{-3}$  o cerca de una sustitución de bases en el gen HA por cada generación viral. <sup>(6)</sup> Las sustituciones de aminoácidos es impulsado en parte por la presión inmune ya que la HA es el principal objetivo en la respuesta

---

inmune del huésped. Aunque los aminoácidos que componen el sitio de unión al receptor son altamente conservados, como la cisteína y la mayoría de los residuos de prolina, el resto de la molécula de HA es altamente mutable. <sup>(22) (19) (20) (100)</sup>

Las primeras etapas de infección por el virus de la influenza inicia con la HA, mediante la unión al receptor y la fusión de membranas. Los receptores que reconocen son el ácido siálico y glicolípidos de glicoproteínas de la superficie celular.

La preferencia del sitio de unión de la HA está dado por uno u otro de estos tipos de receptores y se relaciona con la especificidad de especie para la infección. Para la transferencia entre especies se requieren cambios en la especificidad del sitio de unión. Estos cambios se pueden observar en la HA de la H2 y H3 del virus humano, cambios en los aminoácidos del sitio de unión al receptor, Gln226 a Leu226 y Gly228 a Ser228, esto se correlaciona con la transferencia de virus aviares al humano. Por el contrario, la HA H1 de origen humano adquiere la habilidad de unirse a los receptores humanos que contienen estos cambios en Gln226 y Gly228 <sup>(100)</sup>

## ACTIVIDAD ANTIVIRAL, SUPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO

La respuesta inmune innata actúa como primera línea de defensa contra la invasión de patógenos. Una de esas vías va dirigida en contra de los mecanismos celulares antivirales como el interferon (IFN) <sup>(101)</sup> La proteína NS1 ejerce efectos inhibitorios al interferir con la inducción y producción de IFN, tal es el caso del bloqueo de sensores intracelulares como RIG-I. La activación de RIG-I conduce a la asociación con IPS-1, lo que desencadena la fosforilación de IRF3, activando así genes transcripcionales del IFN-  $\beta$ . Evidencia experimental sugiere que la proteína NS1 puede asociarse con TRIM25, una ubiquitin ligasa que también puede activar a RIG-I, inhibiendo así al promotor del gen del IFN  $\beta$ . <sup>(101) (102)</sup>

Además de sus actividades antagónicas del IFN, también se ha demostrado que la proteína NS1 codifica ARN de silenciamiento supresor (RSS), con actividad supresora de ARNi (ARN de interferencia). El ARNi es uno de los mecanismos

celulares antivirales que facilita la degradación de secuencias específicas de ARN viral en plantas hongos y animales.<sup>(102)</sup>

El ARNi son moléculas de ARN de doble hebra de 20-21 nucleótidos que se originan a partir de un ARN largo de doble hebra (dsARN, double strand *ARN*). La enzima responsable del procesamiento del dsARN en moléculas de ARNi es de la familia ARNsa III. Los ARNi suprimen la expresión de genes diana mediante el corte del ARN mensajero complementario (ARNm) en dos mitades, posteriormente degradadas por la maquinaria celular.<sup>(102) (103)</sup>

## ESCAPE INMUNE

Los virus con menor capacidad, esencialmente los virus ARN (con alta tasa de mutación), pueden utilizar como estrategia la variación de secuencias de aminoácidos en el interior o en las cercanías de los epítomos de los linfocitos T citotóxicos específicos (CTL), evadiendo así la respuesta del huésped.<sup>(6)</sup> Este tipo de variación puede afectar el procesamiento y presentación de péptidos, la unión del péptido inmunogénico de su molécula MHC de clase I ó el reconocimiento de las células T del receptor.<sup>(6) (104)</sup> Hasta hace poco no había evidencia de que los virus de la influenza fueran capaces de escapar a la respuesta inmune de los linfocitos T citotóxicos, ya que todos los epítomos son derivados de proteínas virales internas altamente conservadas.<sup>(104)</sup>

*Rimmelzwaan et al.*, mostraron tres ejemplos de variación en epítomos de CTL de la NP del virus de la influenza, asociado con escape inmune de linfocitos T citotóxicos.<sup>(105) (106)</sup> Las dos primeras implican una mutación en la posición 384 de la NP, que es el residuo de anclaje del alelo HLA-B \* 2705 y el HLA-B \* 08. Se demostró que estas mutaciones surgieron en 1993/1994 y que estas variantes mutantes han reemplazado completamente a las cepas virales que contienen los epítomos de tipo “silvestre”. Por otra parte, el reconocimiento de células T se anuló por completo por la mutación R384G. Un tercer ejemplo de la variación de un epítomo CTL del virus de la influenza fue encontrado en HLA-B \* 3501. Este epítomo inmunodominante mostró amplia variación en la secuencia de aminoácidos. Los linfocitos T citotóxicos específicos no reconocieron cepas

---

recientes del virus de la influenza A, lo que indica escape inmune evadiendo a CTL.<sup>(105)</sup>

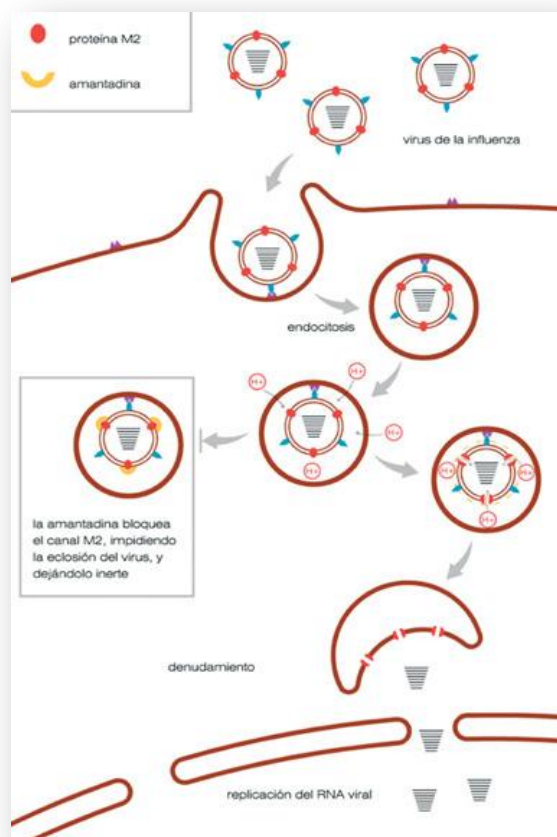
## RESISTENCIA A AMANTADINA

El fármaco Amantadina es eficaz para la prevención y tratamiento de la influenza A, más no para el tipo B y C. Su mecanismo de acción es inhibir la proteína M2, su uso por períodos prolongados puede generar resistencia.<sup>(107) (108) (109)</sup> Respecto a la frecuencia de adquisición de esta resistencia, distintos estudios muestran resultados muy variables: desde 10 a 30% en Chile,<sup>(33)</sup> 22% en Tailandia,<sup>(110)</sup> 70 a 80% en Japón.<sup>(107)</sup> La adquisición de resistencia se debe a mutaciones en los genes que codifican para los aminoácidos constituyentes del dominio transmembrana de la proteína M2. Estas mutaciones ocurren en las posiciones 26, 27 (Val-27-Ala), 30 (Ala-30-Thr) y 31 (Ser-31-Asn), ésta última es la más frecuente.<sup>(33) (107) (108) (109) (110)</sup> Véase *Fig. 18*

El fármaco fue aprobado para la prevención y tratamiento para todas las infecciones de la influenza en 1976 en los EEUU, anteriormente se aprobó para la prevención de la influenza “Asiática” H2N2 en 1966.<sup>(108)</sup>

Los fármacos antivirales contra la influenza son un complemento de la vacunación, más no un sustituto. El aumento en el consumo anual de la amantadina fue drástico después de su aprobación para el tratamiento de la influenza. En Japón, la amantadina fue aprobada en 1975 para el tratamiento en indicaciones neurológicas, incluyendo la enfermedad del Parkinson y para infecciones por el virus de la influenza en 1998.<sup>(108)</sup>

Fig. 18 Función de la proteína M2 en la replicación viral. Rol de la amantadina como antiviral.



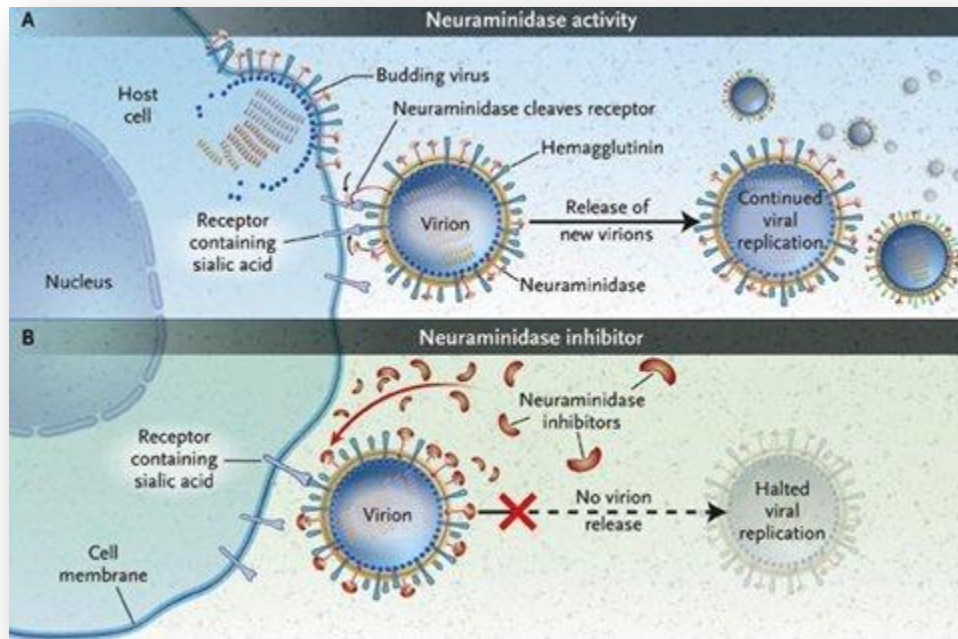
Tomado de: Fehlmann E, Le Corre N, Abarca K, Godoy P, Montecinos L, Veloz A, Ferrés M. Search of amantadine-resistance in influenza A strains isolated in Santiago, Chile, 2001-2002. (33)

## RESISTENCIA A OSELTAMIVIR

Oseltamivir y Zanamivir son fármacos inhibidores de la NA, es activo en infecciones de Influenza A y B. <sup>(111)</sup> Este fármaco se introdujo en la práctica clínica entre 1999 y 2002. La mutación H274Y (sustitución de histidina por tirosina en la posición 274 en el gen de la NA) confiere resistencia hacia el fármaco oseltamivir. Dicha mutación se ha observado en los subtipos H1N1 y H5N1. En estudios de vigilancia epidemiológica realizado en el 2006 se observó que la frecuencia de los virus resistentes al fármaco oseltamivir con mutación H274Y fue del 0.33%. <sup>(112)</sup> Sin embargo, una frecuencia mayor de virus de la influenza A (H1N1) con

resistencia al fármaco fue detectado en varios países de Europa, reportándose el 14% en el año 2008. <sup>(110) (113) (114)</sup> Véase Fig. 19

Fig. 19 Función de la neuraminidasa en la replicación viral. Rol del fármaco oseltamivir como antiviral.



Tomado de: <http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/4043> (09-05-12, 18:10 p.m.) (115)

## DIAGNÓSTICO

El aislamiento viral se considera como la prueba estándar para el diagnóstico de la influenza, sin embargo se necesitan varios días para llevarlo a cabo y es costoso. Existen otros métodos de diagnóstico que han sido empleados para detectar el antígeno de la influenza. Se ha identificado en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, para procedimientos de inmunohistoquímica basados con anticuerpos monoclonales y policlonales. <sup>(13)</sup>

La técnica de hibridación in situ es un valioso complemento a las técnicas estándar de extracción de ARN para la evaluación de la expresión génica en los tejidos y células. Su principal ventaja es la capacidad de determinar qué tejidos o células en una población mixta están expresando el ARN de interés. En las



técnicas de hibridación in situ se han utilizado con éxito para detectar ácidos nucleicos virales con sondas de ADN complementario al ARN viral. <sup>(116)</sup>

La técnica PCR tiempo real (qPCR) es una técnica sensible, rápida y específica y está basada en la PCR convencional pero con la ventaja de poder monitorear la amplificación del ADN usando técnicas de fluorescencia; esto permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y confiabilidad. El gráfico que muestra el equipo mientras se realiza la PCR permite identificar una línea horizontal llamada umbral, que al ser cruzado por la muestra indica la positividad de la misma (Cross threshold o Ct point). Entre más bajo sea el valor Ct de una muestra, mayor es la cantidad de copias genómicas presentes en la muestra. <sup>(117)</sup>

Recientemente, la herramienta por microarreglos se ha venido utilizando, entre otras cosas, para subtipificar a los virus de la influenza. Es un conjunto de sondas de ácidos nucleicos arregladas en una superficie y al cual se pueden hibridar copias de DNA. La hibridación puede detectarse de forma cuantitativa mediante programas computacionales y tecnología láser junto con un marcador fluorescente. <sup>(118)</sup> <sup>(119)</sup> En esta técnica se utilizan microchips para la secuenciación y microchips de hibridación. En el primer caso, el uso de microchips y tecnología de microfluidos se utiliza para la determinación de secuencias de nucleótidos de HA y NA necesarios para la clasificación de los virus. Los microchips especializados se utilizan para determinar un número limitado de tipos de virus de la influenza. <sup>(118)</sup>

#### RFLP's

El análisis de RT-PCR, seguido de digestión enzimática, (RFLP's) se realiza directamente de material respiratorio y provee un método rápido y fácil para el análisis genético. <sup>(120)</sup> El ensayo de PCR-RFLP's, combina la alta sensibilidad de la PCR con la alta especificidad del análisis de restricción. <sup>(99)</sup> Con esta técnica podemos confirmar la presencia de cambios de nucleótidos en la secuencia, modificando así el sitio de restricción. <sup>(121)</sup>

---

Esta técnica se ha utilizado en estudios de genotipificación molecular, <sup>(122)</sup> estabilidad genotípica de las vacunas, <sup>(123)</sup> en estudios de prevalencia sobre resistencia a fármacos antivirales como amantadina y oseltamivir. <sup>(33) (107) (110)</sup>

## JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de la Influenza Porcina se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país, la aplicación de una técnica molecular permitirá identificar la variabilidad que existe en el virus de la Influenza Porcina en México.

## HIPÓTESIS

Se identificará alta variabilidad en los patrones de corte en los genes de la Hemaglutinina y Neuraminidasa del virus de la Influenza Porcina.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar la variabilidad existente en el virus de la influenza porcina en muestras de campo de la República Mexicana.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los patrones de corte obtenidos del RT PCR RFLP's en los genes de la Hemaglutinina y Neuraminidasa.

Conocer la prevalencia del virus de la Influenza porcina mediante qRT PCR.

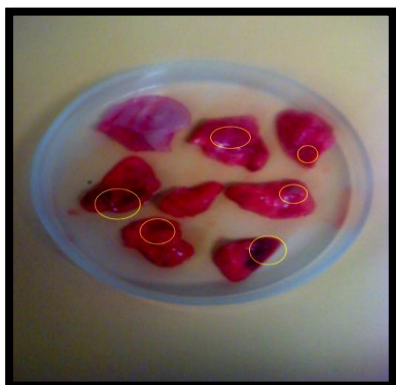
---

## MATERIAL Y MÉTODOS

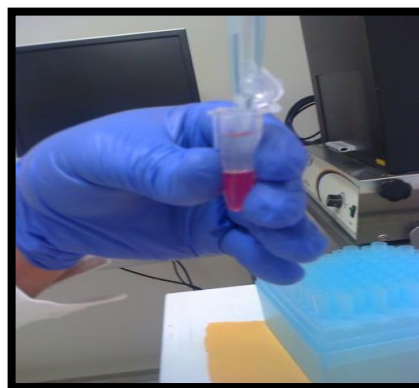
Se realizó muestreo a nivel de rastro y se obtuvieron 1246 muestras de los siguientes estados: Estado de México (149), Veracruz (262), Puebla (90), Jalisco (165), Querétaro (130), Michoacán (13), Guanajuato (127), Tamaulipas (9), Oaxaca (3), Yucatán (140), Hidalgo (6), Guerrero (26), Chiapas (5), Sonora (40), D.F. (25), Campeche (40), Tlaxcala (15), Morelos (1).

Se obtuvieron muestras de pulmón, linfonodos, tráquea y de algunos estados se obtuvieron muestras líquidas de suero y semen. Las muestras fueron maceradas en licuadora con MEM (medio mínimo esencial), posteriormente el líquido que se obtuvo fue centrifugado a 3,500 rpm durante 30 minutos obteniendo el sobrenadante para realizar la extracción del ARN viral.

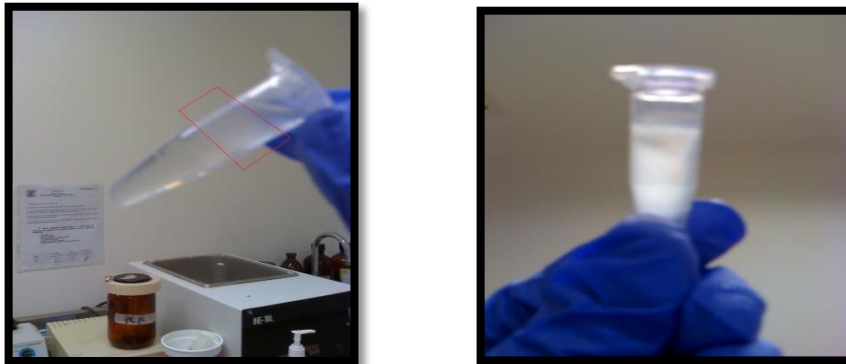
Tamaño de muestra



Extracción de ARN



## Fase de ARN



### EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL

Se tomaron 500  $\mu\text{l}$  de la muestra (macerado de pulmón, tráquea, linfonodos, o suero o semen) y se se adicionó 500  $\mu\text{l}$  de Trizol<sup>®</sup> Reagent, se incubó por 10 minutos a 4°C, se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitó con vortex por 15 segundos incubándose 10 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se separó la fase del ARN en tubos eppendorf y se adicionó 1 volumen de isopropanol, incubándose por 15 minutos a 4°C, después se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el isopropanol se decantó y la pastilla de ARN se lavo con 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, esto se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se decantó el etanol dejando secar la pastilla, una vez seca se resuspendió en 20-40  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.1%.

### PCR EN TIEMPO REAL

Se realizó la técnica de PCR en Tiempo Real con el Kit- FIND-IT INFLUENZA de Biotecnologías Moleculares, S.A. de C.V. para identificar el virus de la influenza tipo A y cuantificar las muestras positivas, empleando como blanco de amplificación el gen M del virus de la Influenza.

El procedimiento del ensayo se realizó de la siguiente manera: En un tubo eppendorf se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de la muestra de ARN o del control positivo y se

añadieron 10 µl de la Super Mix RT-PCR-TR 2X. Véase **Tabla 1** Las condiciones de amplificación

Tabla 1 *Condiciones de amplificación Tiempo Real*

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	42	30 minutos
1 ciclo	95 °C	10 minutos
40 ciclos	95 °C 60 °C	15 segundos 45 segundos

Se utilizó el Termociclador Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 (Build 75) Copyright ©2000-2006 Corbett Research, a Division of Corbett Life Science. All rights reserved. ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313).

Análisis de datos:

\*Una muestra es considerada positiva siempre que la fluorescencia emitida sea mayor a la de los controles negativos.

\*Una muestra es considerada negativa siempre que la fluorescencia emitida sea menor o igual a la de los controles negativos.

\*Una muestra puede ser cuantificable siempre que la fluorescencia emitida se encuentre en el rango de fluorescencia de la curva estándar.

\*Entre más bajo sea el valor Ct de una muestra, mayor es la cantidad de copias genómicas presentes en la muestra.

Las muestras que resultaron positivas a qPCR se inocularon en embrión de pollo para obtener aislamientos virales. A continuación se describe la técnica:

#### AISLAMIENTO VIRAL

Después de que las muestras de campo fueran maceradas en licuadora con MEM (medio mínimo esencial) el líquido obtenido fue centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos obteniendo el sobrenadante, el cual fue filtrado con prefiltros y posteriormente con filtros de 0.45 µm y 0.22 µm. Se inocularon 200µl del líquido filtrado a embriones de pollo SPF (Libres de Patógenos Específicos) de 9 a 11 días de edad en cavidad alantoidea y se incubaron a 37°C. Los embriones que murieron a las 24 hrs fueron eliminados. La colecta del líquido corioalantoideo se realizó a las 48 y 72 hrs postinoculación en tubos de 10ml para después centrifugarlo a 3,500 rpm durante 5 minutos. Se utilizaron los virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) como controles positivos. Posterior a la colecta se realizó la titulación de cada uno de los virus por hemoaglutinación de la siguiente manera: Se colocaron 50µl de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) con un pH de 7 a 7.2 en una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo en "U". Se colocó 50µl de virus y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 2 hasta 4096. Se colocaron 50µl por pozo de una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los botones del control de eritrocitos para posteriormente realizar la lectura. <sup>(124)</sup>

Después a esto se hizo la extracción de ARN viral de dichos aislamientos para identificar el subtipo presente en la muestra mediante One Step RT-PCR. A continuación se describe la técnica, véase las condiciones de PCR en la **Fig. 20**.

#### ONE STEP RT-PCR

KIT QIAGEN®. No. de Catalogo 210212

En un tubo eppendorf se colocaron:

3.3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPEC

1.5  $\mu$ l del ARN problema

2  $\mu$ l de buffer 5X (RT)

2  $\mu$ l de buffer 5X (Q)

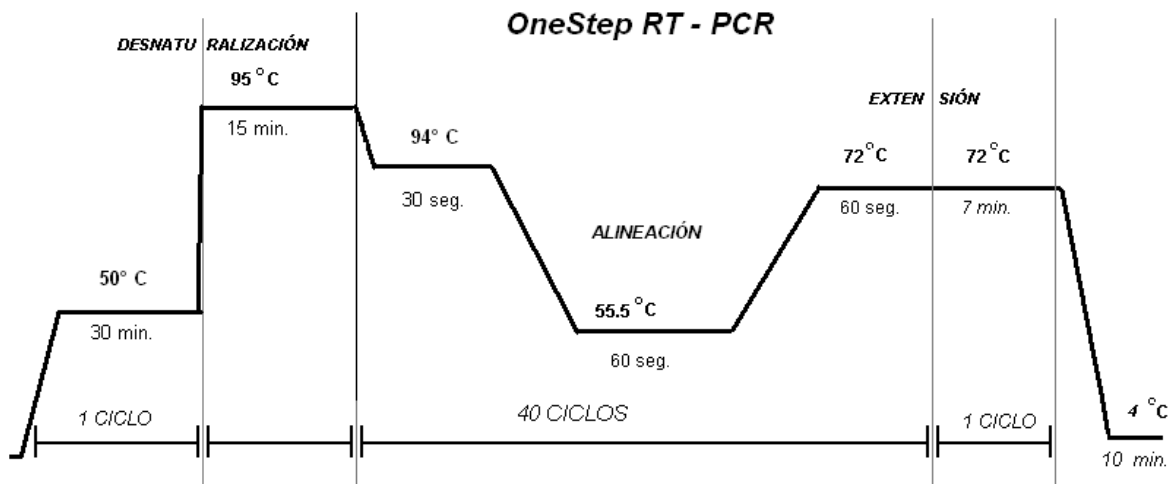
0.4  $\mu$ l dNTPs

0.4  $\mu$ l primer H1F-R, N1F-R o H3F-R, N2F-R (Véase *Tabla 2*)

0.4  $\mu$ l Mix de enzimas

12.4  $\mu$ l. Volumen total

Fig. 20. Condiciones de RT PCR One Step



## ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La evaluación de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2% con TAE 1x. Se colocaron 4  $\mu$ l de marcador de peso molecular en el primer pozo y en los siguientes pozos se colocaron 7  $\mu$ l de producto de PCR mezclado con 1.5  $\mu$ l de azul de bromofenol. La fuente de poder permaneció a 90 volts durante 120 minutos, posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 10 minutos, las bandas se visualizaron por luz ultravioleta (UV) con la ayuda de un transiluminador.



## CONTROLES

Positivo: Véase Fig. **21**

H1: Banda con peso molecular de 1006 pb

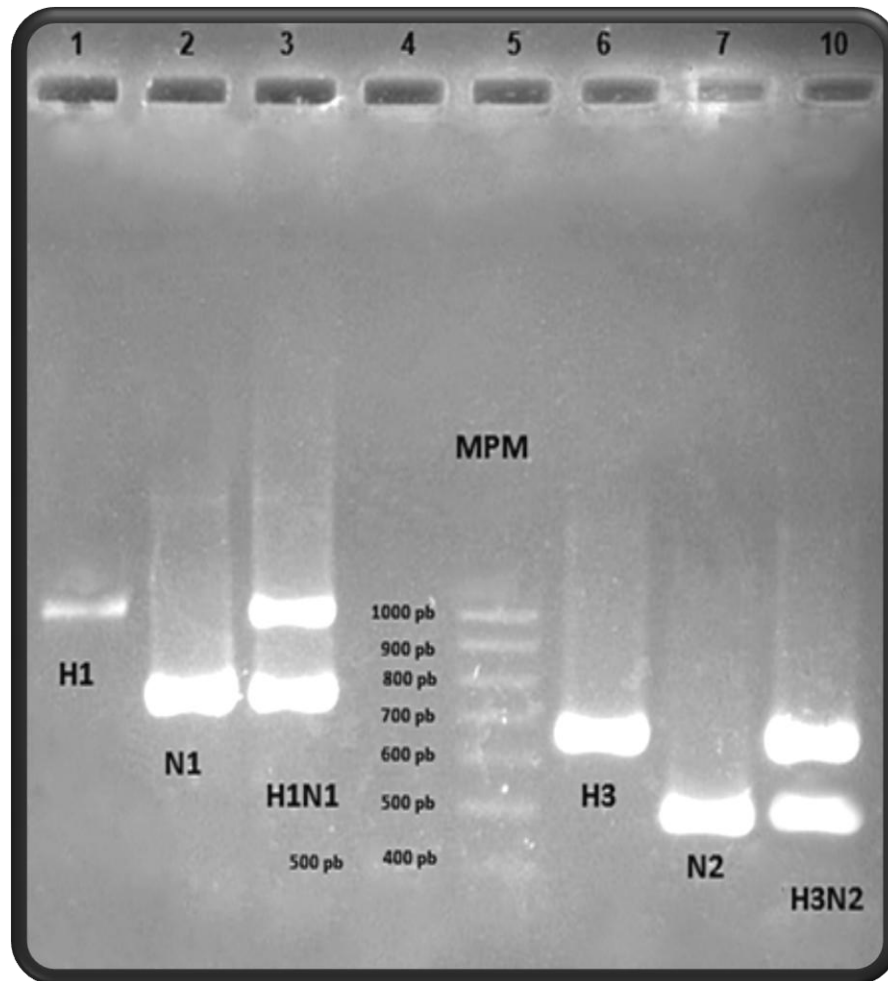
N1: Banda con peso molecular de 754 pb

H3: Banda con peso molecular de 663 pb

N2: Banda con peso molecular de 502 pb

Negativo: Ausencia de bandas a partir de una muestra negativa conocida.

Fig. 21. *Controles positivos*



H1: Influenza A virus [(A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)).  
N1: Influenza A virus [(A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)).  
H3: Influenza A virus [(A/Swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)).  
N2: Influenza A virus [(A/Swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)).

## OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

*Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para detectar los genes H1, N1, H3, N2 del virus de la influenza porcina.*

NOMBRE DEL VIRUS	INICIADOR	SECUENCIA 5'3'	AMPLICON
[A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)]	H1F	GGGACATGTTACCCAGGAGAT	1007 pb
	H1R	GCATTGTATGTCCAAATATCCA	
	N1F	GGTTCCAAAGGAGACATTTTTG	754 pb
	N1R	CTATCCAAACACCATTGCCATA	
[A/Swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)]	H3F	TATGCCTGGTTTTCGCTCAA	650 pb
	H3R	TTCGGGATTACAGTTTGTTG	
	N2F	TGCGATCCTGACAAGTGTTATC	502 pb
	N2R	CAGACACATCTGACACCAGGAT	

*Tabla 3. Oligonucleótidos (a) sintetizados para detectar el gen H subtipo 1 del virus de la influenza porcina.*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicon
H1 F	GGGACATGTTACCCAGGAGAT	220 pb
H1 (a) R	CCATTGGAGCACATC	

*Tabla 4. Oligonucleótidos (b) sintetizados para detectar el gen H subtipo 1 del virus de la influenza porcina.*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicon
H1 F	GGGACATGTTACCCAGGAGAT	190 pb
H1 (b) R	GGAGACCAACAGTACCA	

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para detectar el gen M del virus de la influenza.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicon
M F	AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	239 pb
M R	CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC	

Por otro lado, para hacer el diseño de oligonucleótidos y generar los patrones posibles de corte con diferentes enzimas de restricción (véase Fig. 23 a Fig. 32), se obtuvieron 482 secuencias del GenBank de los genes H y N; de los subtipos virales H1N1 y H3N2, usando también el programa computacional Clone Manager versión 5.0. Véase Fig. 22 a continuación el origen de las secuencias obtenidas.

Fig. 22. Mapa de la procedencia de las secuencias obtenidas del Gen Bank

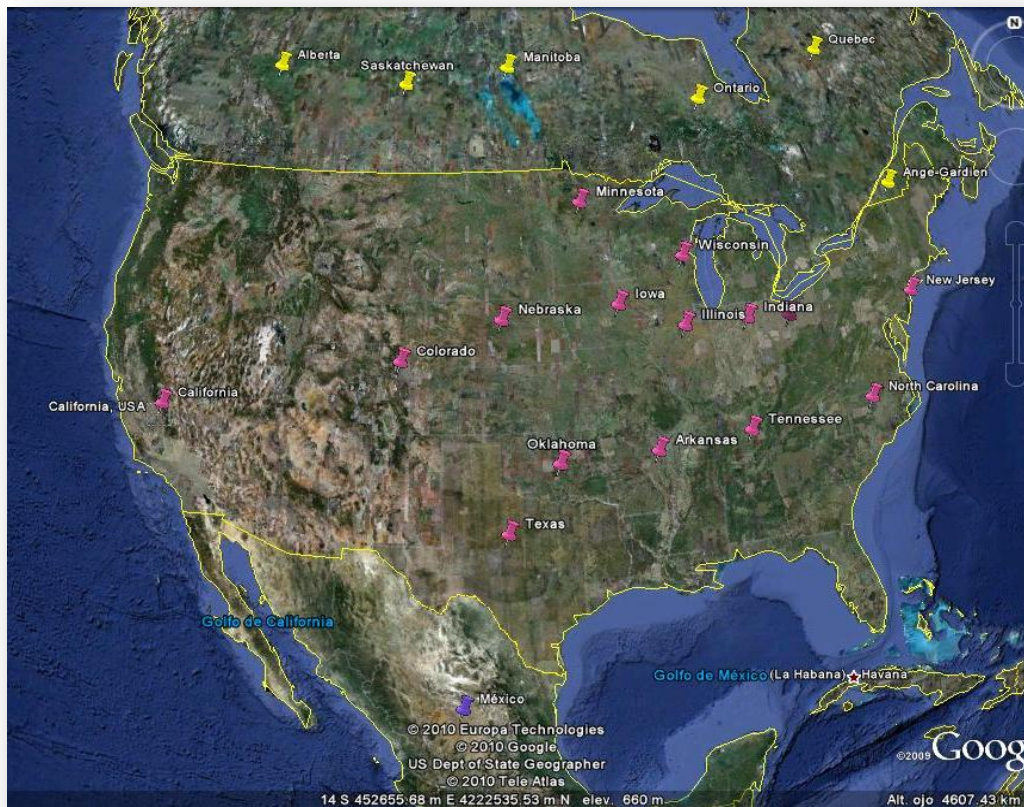


Fig. 23. Mapa de alineación de los oligonucleótidos H1 F y H1 R



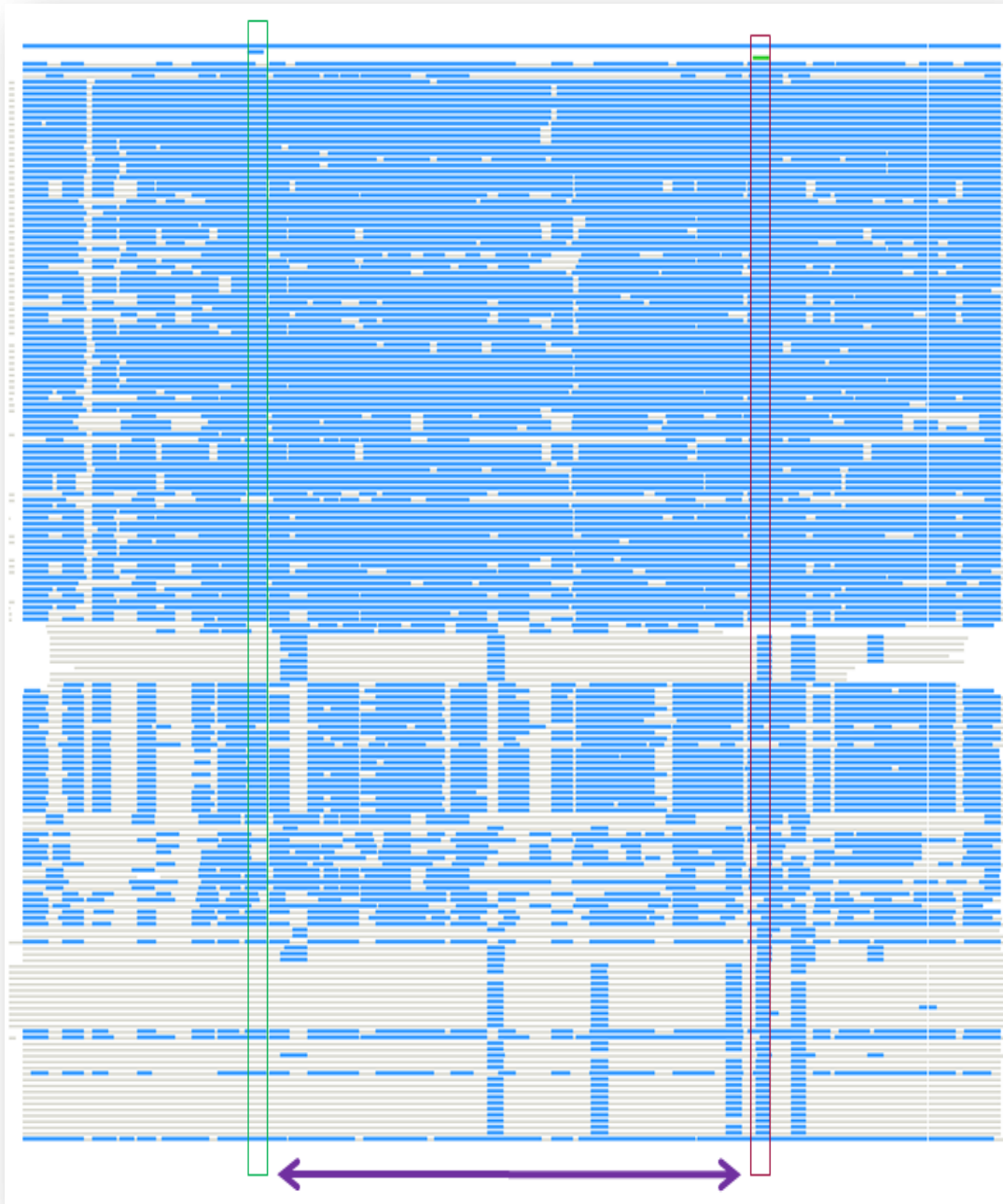
Se obtuvieron 271 secuencias del virus de la Influenza tipo A del Genbank. Las secuencias se analizaron con el Programa Clone Manager para obtener el mapa de alineación de los oligonucleótidos y comparar con las secuencias obtenidas. En recuadro verde Forward, en recuadro rojo Reverse, tamaño del amplicón: 1007 pb. En primera posición, secuencia del virus control positivo H1N1. En azul se observan las secuencias que muestran homología con la secuencia utilizada como control positivo. Nótese que el oligonucleótido Reverse no se alinea en la mayoría de las secuencias obtenidas del genbank.

Fig. 24. Mapa de alineación de los oligonucleótidos H3 F y H3 R



Se obtuvieron 72 secuencias del virus de la Influenza tipo A del Genbank. Las secuencias se analizaron con el Programa Clone Manager para obtener la posición de los oligonucleótidos y comparar con las secuencias obtenidas. En recuadro verde Forward, en recuadro rojo Reverse, tamaño del amplicón: 650 pb. En primera posición, secuencia del virus control positivo H3N2. En azul se observan las secuencias que muestran homología con la secuencia utilizada como control positivo.

Fig. 25. Mapa de alineación de los oligonucleótidos N1 F y N1 R



Se obtuvieron 182 secuencias del virus de la Influenza tipo A del Genbank. Las secuencias se analizaron con el Programa Clone Manager para obtener la posición de los oligonucleótidos y comparar con las secuencias obtenidas. En recuadro verde Forward, en recuadro rojo Reverse, tamaño del amplicón: 754 pb. En primera posición, secuencia del virus control positivo H1N1. En azul se observan las secuencias que muestran homología con la secuencia utilizada como control positivo.

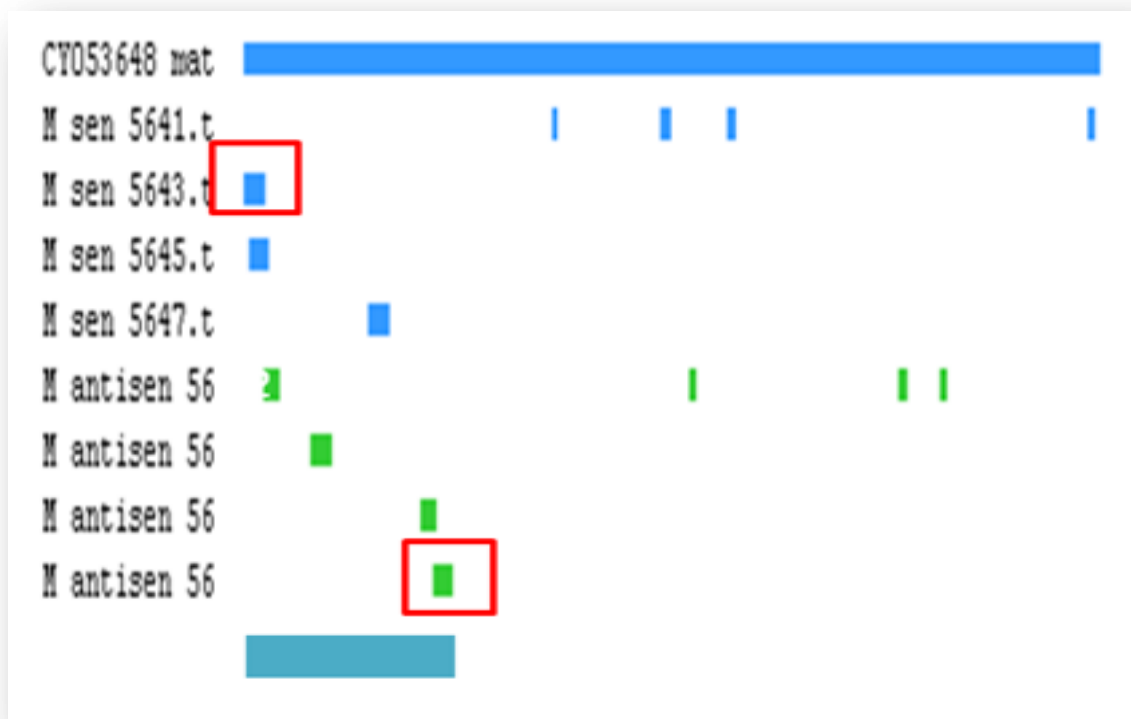


Fig. 26. Mapa de alineación de los oligonucleótidos N2 F y N2 R



Se obtuvieron 182 secuencias del virus de la Influenza tipo A del Genbank. Las secuencias se analizaron con el Programa Clone Manager para obtener la posición de los oligonucleótidos y comparar con las secuencias obtenidas. En recuadro verde Forward, en recuadro rojo Reverse, tamaño del amplicón: 502 pb. En primera posición, secuencia del virus control positivo H3N2. En azul se observan las secuencias que muestran homología con la secuencia utilizada como control positivo.

Fig. 27. Mapa de alineación de los oligonucleótidos del gen M



Se utilizó el Programa Clone Manager para obtener el mapa de alineación de los oligonucleótidos. En recuadro verde Forward, en recuadro rojo Reverse, tamaño del amplicon: 239 pb. En primera posición, secuencia del gen M del virus.

## SELECCIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para identificar diferencias en los patrones de corte, se utilizaron las secuencias de los controles positivos obtenidas del genBank (véase Tabla 6 a Tabla 9) y también algunas que mostraran diferencias notables en su secuencia (cambio de nucleótidos, ausencia de segmentos) y con ayuda del programa Clone Manager versión 5.0 se “cortaron” con algunas enzimas de restricción. Esto nos mostraba si la enzima seleccionada hacía cortes en las secuencias obtenidas, el número de cortes y el peso de los fragmentos. Esto se realizó con los genes H1, H3, N1 y N2. Véase Fig. 23-Fig. 26.

Tabla 6. *Patrones de corte del amplicon del gen H1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo [A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)]. Amplicon de 1006 pb.*

Enzima	Cortes	Fragmentos	Tamaño		
<i>BsgI</i>	0	-	-	-	-
<i>BspHI</i>	2	3	114	441	452
<i>HaeIII</i>	1	2	108	899	
<i>HincII</i>	1	2	237	770	
<i>HpaII</i>	0	-	-	-	-
<i>Scal</i>	1	2	294	713	
<i>TfiI</i>	1	2	77	930	

Tabla 7. *Patrones de corte del amplicon del gen H3 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo [A/Swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)]. Amplicon de 663 pb.*

Enzima	Cortes	Fragmentos	Tamaño		
<i>BsgI</i>	1	2	191	473	
<i>BspHI</i>	0	-	-	-	-
<i>HaeIII</i>	0	-	-	-	-
<i>HincII</i>	0	-	-	-	-
<i>HpaII</i>	2	3	28	296	340
<i>Scal</i>	0	-	-	-	-
<i>TfiI</i>	1	2	187	477	

Tabla 8. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo [A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)]. Amplicon de 754 pb.

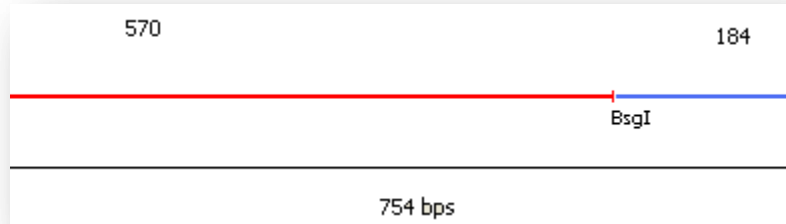
Enzima	Cortes	Fragmentos	Tamaño			
<i>Bsgl</i>	1	2	570	184		
<i>BspH1</i>	1	2	23	731		
<i>HaeIII</i>	2	3	410	273	71	
<i>HincII</i>	0	-	-	-	-	-
<i>HpaII</i>	1	2	263	491		
<i>MboII</i>	1	2	471	283		
<i>SalI</i>	1	2	689	65		
<i>TfiI</i>	5	4	199	374	27	159

Tabla 9. Patrón de corte del amplicon del gen N2 de la secuencia de referencia utilizada como control [A/Swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)]. Amplicon de 502 pb.

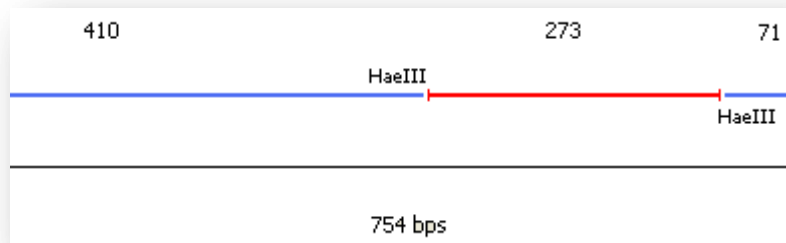
Enzima	Cortes	Fragmentos	Tamaño		
<i>BstNI</i>	2	3	307	178	18
<i>MboII</i>	1	2	386	117	
<i>MaeI</i>	1	2	239	264	

## MAPAS DE DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

*Fig. 28. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Bsg I*



*Fig. 29. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Hae III*

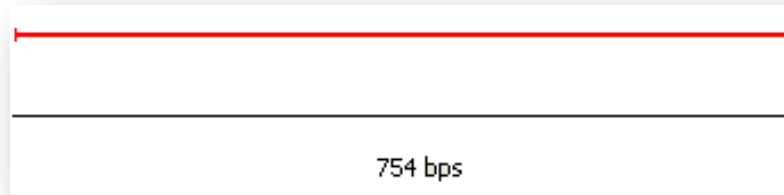


*Fig. 30. Patrón de corte del amplicon del gen N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Hpa II*



*Fig. 31. Patrón de corte del amplicon del N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Hinc II*

La enzima Hinc II no hace cortes en la secuencia del amplicon de N1



*Fig. 32. Patrón de corte del amplicon del N1 de la secuencia de referencia utilizada como control positivo con la enzima Mbo II*



#### VARIABLES DE ESTUDIO:

1. Muestras positivas por subtipo.
2. Muestras positivas por estado.
3. Número de variantes para el gen H
4. Número de variantes para el gen N

De los resultados obtenidos se realizará estadística descriptiva por estado y por subtipo.

## RESULTADOS

De un total de 1246 muestras provenientes de rastro, (véase *Fig. 34*) 791 muestras resultaron positivas al virus de la influenza porcina, (véase *Tabla 10*) lo que representa una prevalencia del 63.48%, de estas muestras positivas se logró obtener un total de 33 aislamientos virales. (Véase *Tabla 11*)

Los estados con muestras positivas fueron: Estado de México (47), Veracruz (197), Puebla (10), Jalisco (163), Querétaro (130), Michoacán (10), Guanajuato (125), Tamaulipas (9), Oaxaca (3), Yucatán (0), Hidalgo (6), Guerrero (15), Chiapas (5), Sonora (30), D.F. (25), Campeche (0), Tlaxcala (15), Morelos (1). Yucatán y Campeche fueron los estados que resultaron negativos. Véase *Fig. 33*

Tabla 10 Muestreo a nivel de rastro

<b>Estado</b>	<b>Total</b>	<b>Positivas</b>	<b>%</b>
Veracruz	262	197	75.19
Sonora	40	30	75.00
Estado de México	149	47	31.54
Puebla	90	10	11.11
Hidalgo	6	6	100
Guerrero	26	15	57.69
D.F.	25	25	100.00
Guanajuato	127	125	98.43
Michoacán	13	10	76.92
Jalisco	165	163	98.79
Tamaulipas	9	9	100
Oaxaca	3	3	100
Chiapas	5	5	100
Querétaro	130	130	100
Yucatán	140	0	0
Morelos	1	1	100
Campeche	40	0	0
Tlaxcala	15	15	100
<b>Total</b>	<b>1246</b>	<b>791</b>	<b>63.48</b>

Fig. 33. Prevalencia del virus de la influenza porcina mediante qRT-PCR

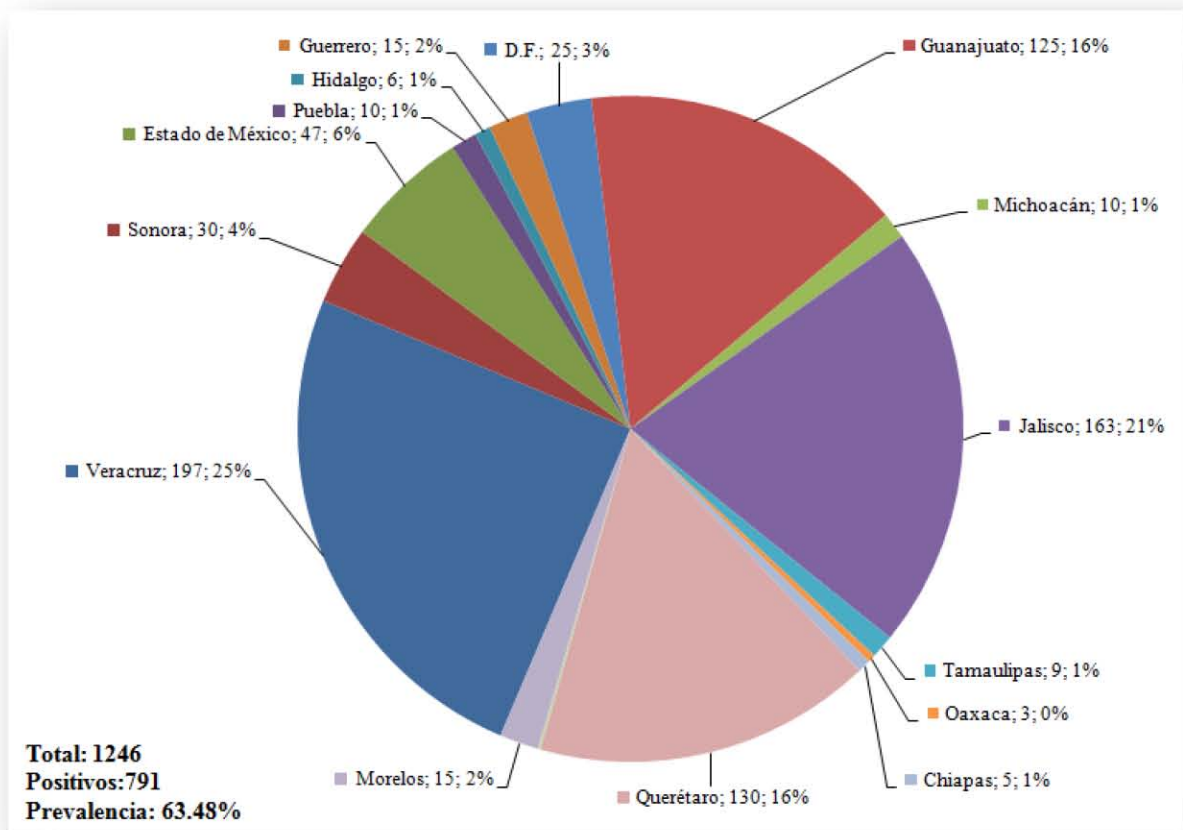




Fig. 34. Mapa de muestreo



En este estudio se encontró la presencia del virus en muestras de semen y se logró el aislamiento viral a partir de esta muestra.

Se identificaron bandas de aproximadamente 100 pb, hallazgo que se ha reportado en varios sitios del mundo, en el que existe la presencia de recombinación genética entre genes de tipo porcino, humano y aviar en el gen M. Véase **Fig. 37**

Con los oligonucleótidos de la tabla 6 se pudo diferenciar al virus de campo del virus vacunal. No hubo amplificación de este segmento para las muestras positivas de campo, lo que indica que los animales no fueron vacunados.

---

Once aislamientos virales de un total de treinta y tres resultaron positivos para el gen N1, 6 para H1N1 y 3 para H3N2, lo que representa un 33, 18 y 9% respectivamente. Véase *Fig. 33* En el resto de las muestras no fue posible identificar amplicones para H1, H3, N1 y N2, lo que nos sugiere la presencia de variabilidad genética en los virus presentes en las muestras.

Tabla 11. Esquema de resultados

qPCR gen M (+)	Aislamiento Viral	Titulo HA	Gen/subtipo RT-PCR	Fecha de muestreo
0	(A/swine/ Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)	N1	09/09/2009
1	(A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)	N1	09/09/2009
2	(A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)	N1	09/09/2009
3	(A/swine/Tamaulipas 3/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)	N1	21/09/2009
4	(A/swine/Tamaulipas 4/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)	N1	22/09/2009
7	(A/swine/Veracruz 7/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)	N1	22/09/2009
19	(A/swine/Estado de México 19/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)	H1N1	10/11/2009
20	(A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)		04/12/2009
23	(A/swine/Estado de México 23/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)	(+)		04/12/2009
26	(A/swine/Jalisco 26/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		14/01/2010
27	(A/swine/Jalisco 27/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		21/01/2010
29	(A/swine/Veracruz 29/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)	H1N1	21/01/2010
31	(A/swine/Veracruz 31/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)	N1	21/01/2010

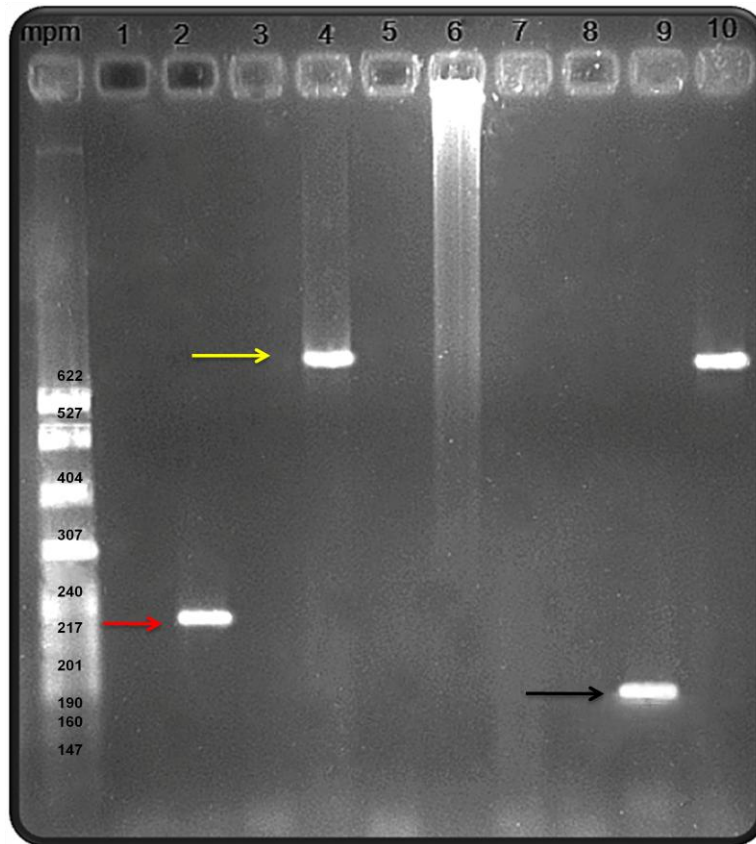
32	(A/swine/Querétaro 32/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)	H1N1	21/01/2010
35	(A/swine/Querétaro 35/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)	H1N1	02/02/2010
36	(A/swine/Guanajuato 36/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		02/02/2010
37	(A/swine/Veracruz 37/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	1024	H1N1	02/02/2010
40	(A/swine/Michoacán 40/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	16	H3N2	02/02/2010
46	(A/swine/Hidalgo 46/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		01/06/2010
47	(A/swine/Estado de México 47/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		01/06/2010
48	(A/swine/Estado de México 48/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)	N1	01/06/2010
49	(A/swine/Estado de México 49/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)	N1	01/06/2010
50	(A/swine/Estado de México 50/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	1024	H3N2, N1	01/06/2010
51	(A/swine/Estado de México 51/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	1024	H3N2, N1	01/06/2010
52	(A/swine/Estado de México 52/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	2048	H1N1	01/06/2010
67	(A/swine/Sonora 67/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		13/10/2010
68	(A/swine/Guerrero 68/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		13/11/2010
69	(A/swine/Distrito Federal 69/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		13/11/2010
70	(A/swine/Tlaxcala 70/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		13/11/2010

71	(A/swine/Puebla 71/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)	(+)		13/11/2010
74	(A/swine/Hidalgo 74/DMZC.FMVZ.UNAM/2011)	(+)		01/02/2011
75	(A/swine/Morelos 75/DMZC.FMVZ.UNAM/2011)	(+)		01/02/2011

## PCR One Step

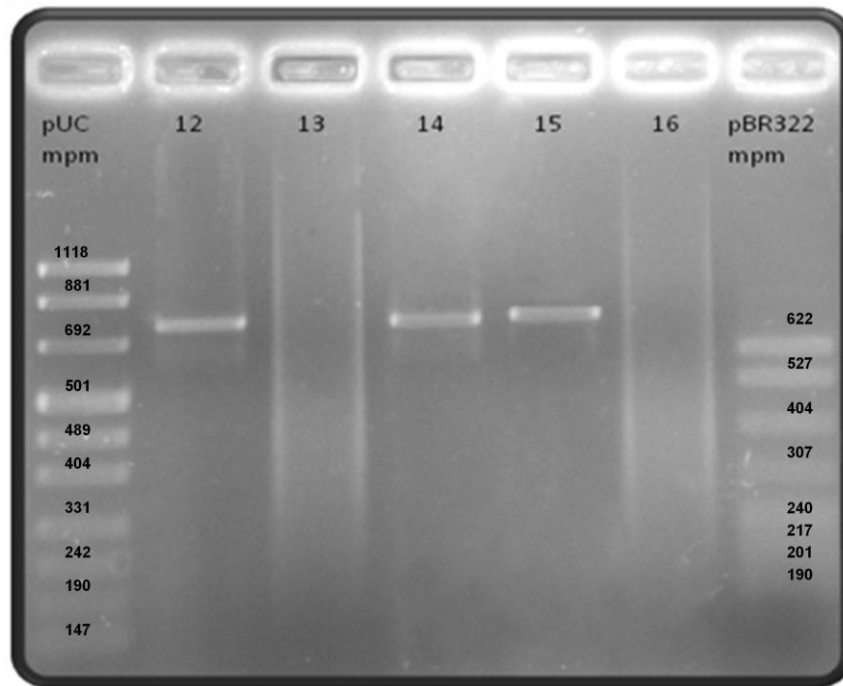
Se realizó One Step RT PCR punto final a los controles positivos y a la vacuna comercial, usando diferentes pares de oligonucleótidos.

*Fig. 35. Controles positivos de H1N1, H3N2 y control vacunal de H1N1.*



Carril 1, 2 y 3: virus H1N1. Carril 4: N1. Carril 5: H3. Carril 6: N2. Carril 1-6 se usaron los oligonucleótidos de la *Tabla 2*. Carril 7, 8 y 9: H1 vacunal, usando los oligonucleótidos de la *Tabla 2*, *Tabla 3* y *Tabla 4* respectivamente. Carril 10: N1 vacunal, usando los oligonucleótidos de la *Tabla 2*. Marcador de peso molecular: pBR 322, carril 2: banda de aprox. 220 pb (flecha roja) compatible con el gen H del virus control positivo, carril 4 y 10 banda de aprox. 650 pb compatible con el gen N1 del control positivo (flecha amarilla), carril 9: banda de aprox. 190 pb compatible con el gen H del virus vacunal (flecha negra).

Fig. 36. Muestras de campo con diferentes pares de oligonucleótidos

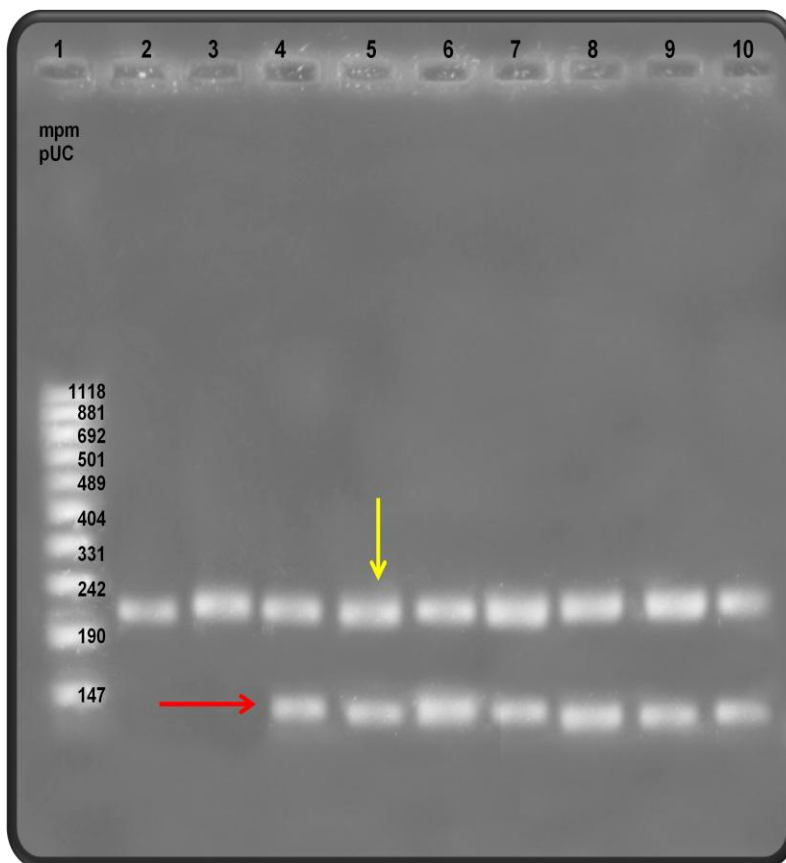


Carril 11: Mpm pUC 8. Carril 12: H1N1 virus control positivo. Carril 13 y 14: Muestra de campo (1), carril 15 y 16: Muestra de campo (2). Marcador de peso molecular: pBR322. Se usaron los oligonucleótidos de la *Tabla 2*. En el carril 12, 14 y 15 se observan bandas de aprox. 750 pb compatible con el gen N1.

## IDENTIFICACIÓN DEL GEN M

Se realizó One Step RT PCR punto final para identificar el gen M en las muestras de campo.

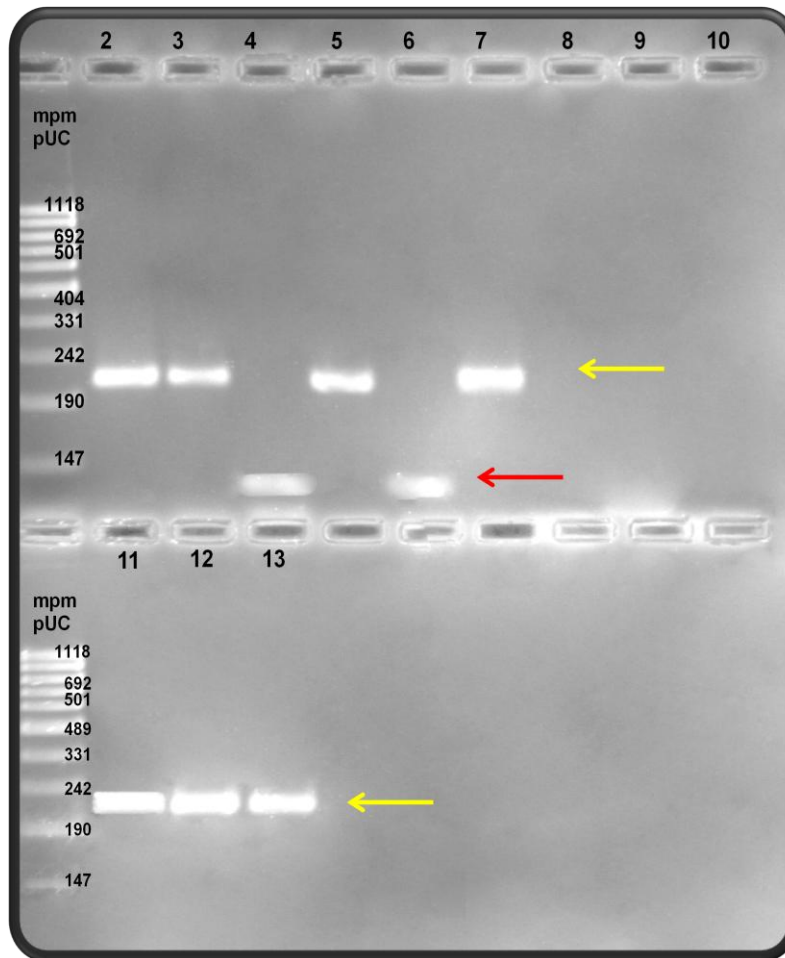
*Fig. 37. RT PCR Punto final en muestras de campo (0 – 36)*



Carril 1 Mpm pUC 8, carril 2 y 3 controles positivos H1N1 y H3N2, carril 4-10, muestras de campo 0-36 usando los oligonucleótidos de la *Tabla 5*. Carril 2-10: banda de aprox. 239 pb (flecha amarilla) compatibles con el gen M. Carril 4-10: identificación de bandas de aprox. 100 pb (flecha roja).

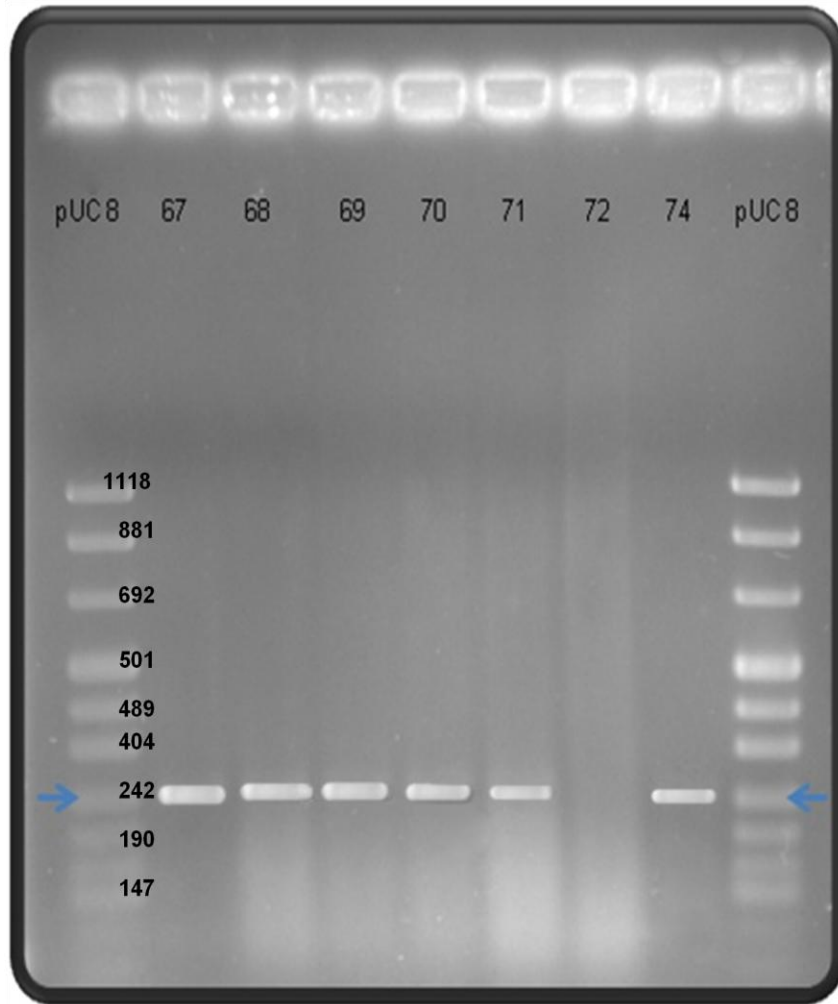


Fig. 38. RT PCR Punto final en muestras de campo (37 – 66)



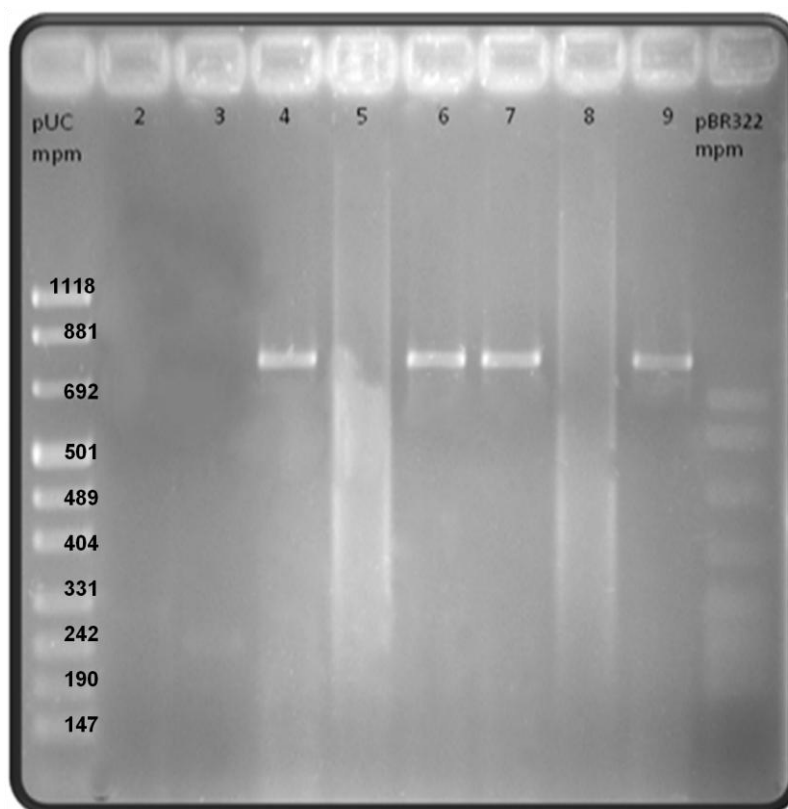
Carril 1: Mpm pUC 8, carril 2 y 3 controles positivos H1N1 y H3N2, carril 4-13, muestras de campo 37-66 usando los oligonucleótidos de la *Tabla 5*. Carril 2-13: banda de aprox. 239 pb (flecha amarilla) compatibles con el gen M. Carril 4 y 6: Identificación de bandas de aprox. 100 pb (flechas rojas).

Fig. 39. RT PCR Punto final en muestras de campo (67 – 74)



Carril 1 y 9: Mpm pUC 8, carril 2-8, muestras de campo 67-74 usando los oligonucleótidos de la *Tabla 5*. Carril 2-8: banda de aprox. 239 pb (flecha amarilla) compatibles con el gen M.

Fig. 40. Gen N1 de muestras de campo con diferentes pares de oligonucleótidos



Carril 1: mpm pUC 8. Carril 2 y 3: H1N1 virus control positivo, usando los oligonucleótidos de la *Tabla 2* (F), *Tabla 3* (R) y *Tabla 4* (R) respectivamente. Carril 4: N1 virus control positivo usando los oligonucleótidos de la *Tabla 2*. Carril 5: H3N2 virus control positivo, usando los oligonucleótidos de la *Tabla 2*. Carril 6: Muestra de campo (0) usando los oligonucleótidos para H1 (Forward) y N1 de la *Tabla 2*, y Reverse (a) de la *Tabla 3*. Carril 7: Muestra de campo (0) usando los oligonucleótidos de la H1 (Forward) y N1 de la *Tabla 2*, y Reverse (b) de la *Tabla 4*. Carril 8: Muestra de campo (0) usando los oligonucleótidos para H3N2 de la *Tabla 2*. Carril 9: Muestra de campo (1) usando los oligonucleótidos para H1 (Forward) y N1 de la *Tabla 2*, y Reverse (a) de la *Tabla 3*. Carril 10: mpm pBR322. Carril 4, 6, 7 y 9: banda de aprox. 650 pb compatibles con el gen N1.

Posteriormente se realizó One Step RT PCR punto final para identificar el gen N1. A continuación se enlistan los aislamientos virales que amplificaron banda para el gen N1.

#### IDENTIFICACIÓN DE AMPLICONES DE N1:

A/swine/Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

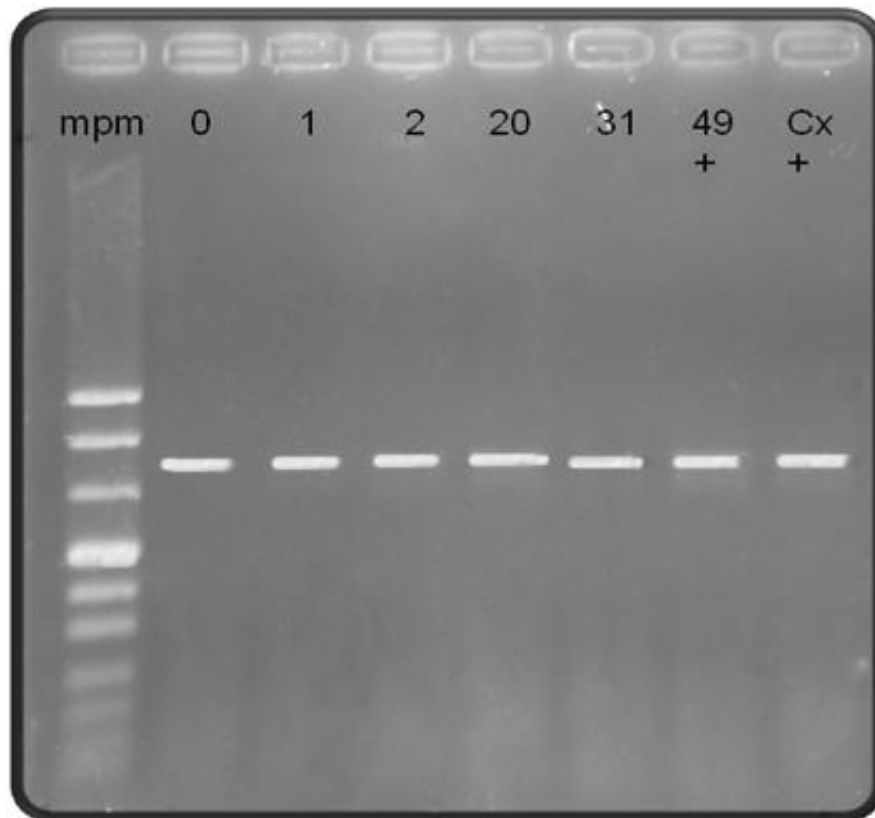
A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

A/swine/Veracruz 31/DMZC.FMVZ.UNAM/2010

A/swine/Estado de México 49/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

A/swine/Control positivo/DMZC.FMVZ.UNAM/2011

*Fig. 41. Identificación del gen N subtipo 1 en muestras de campo*



Carril 1: mpm pUC 8. Carril 2 al 7: bandas de aprox. 650 pb compatibles con el gen N1. Carril 8: control positivo para el gen N1. Se usaron los oligonucleótidos para N1 de la *Tabla 2*

## CORTES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se realizaron RFLP's para identificar variaciones genómicas a través de geles de agarosa identificando los patrones de corte en el gen NA con las enzimas de restricción BsgI, HaeIII, HpaII y MboII en los siguientes aislamientos virales:

A/swine/Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

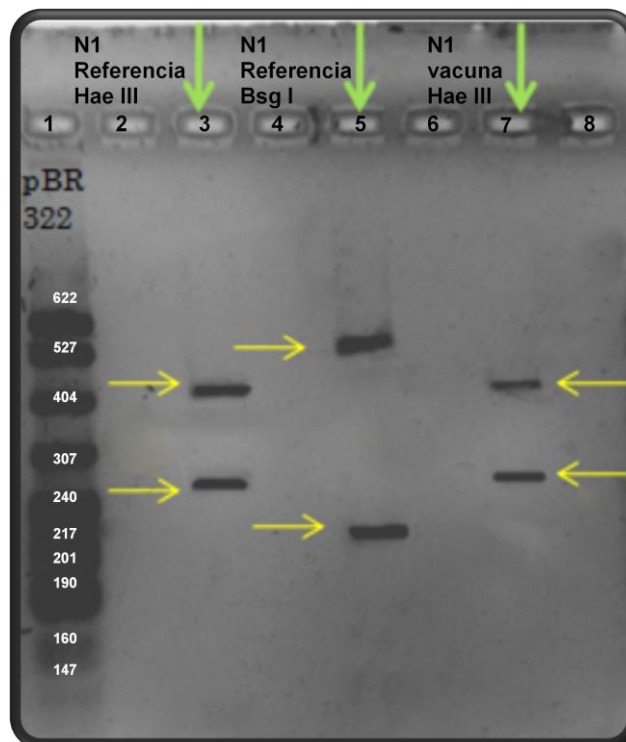
A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

A/swine/Veracruz 31/DMZC.FMVZ.UNAM/2010

A/swine/Estado de México 49/DMZC.FMVZ.UNAM/2009

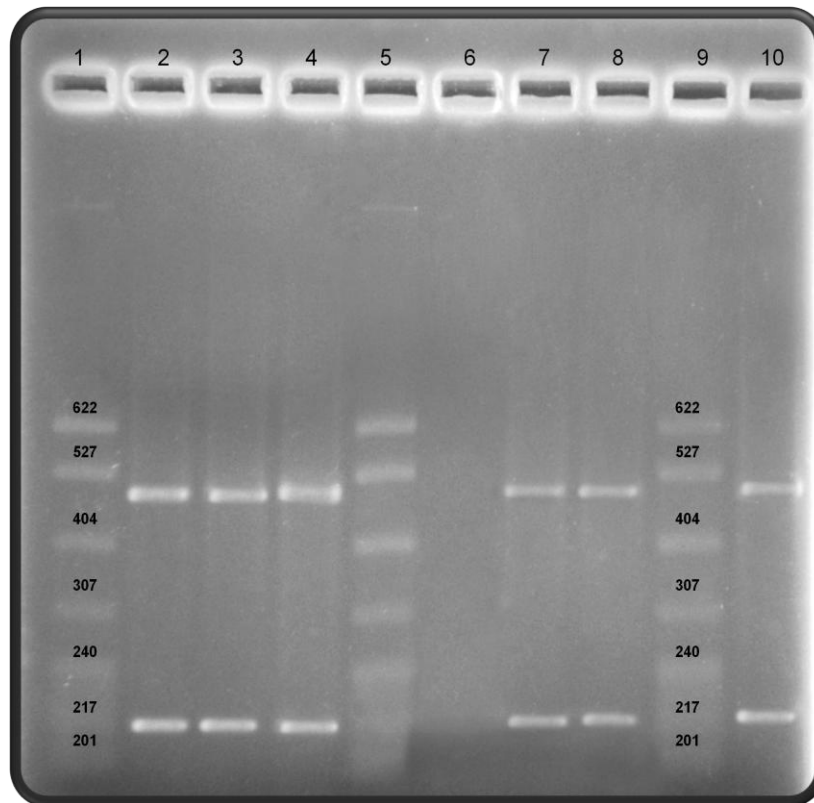
A/swine/Control positivo/DMZC.FMVZ.UNAM/2011

**Fig. 42.** Patrones de corte. Gen N subtipo 1 de los controles de referencia y la vacuna



**Figura 42.** Carril 1: mpm pBR 322. Carril 2: Corte del amplicon de N1 referencia con la enzima *Hae* III. Se observan 2 fragmentos de aprox. 400 y 240 pb. Carril 4: Corte del amplicon de N1 vacunal con la enzima *Bsg*I. Se observan 2 fragmentos de aprox. 550 y 217 pb. Carril 7: Corte del amplicon de N1 referencia con la enzima *Hae* III. Se observan 2 fragmentos de 400 y 240 pb.

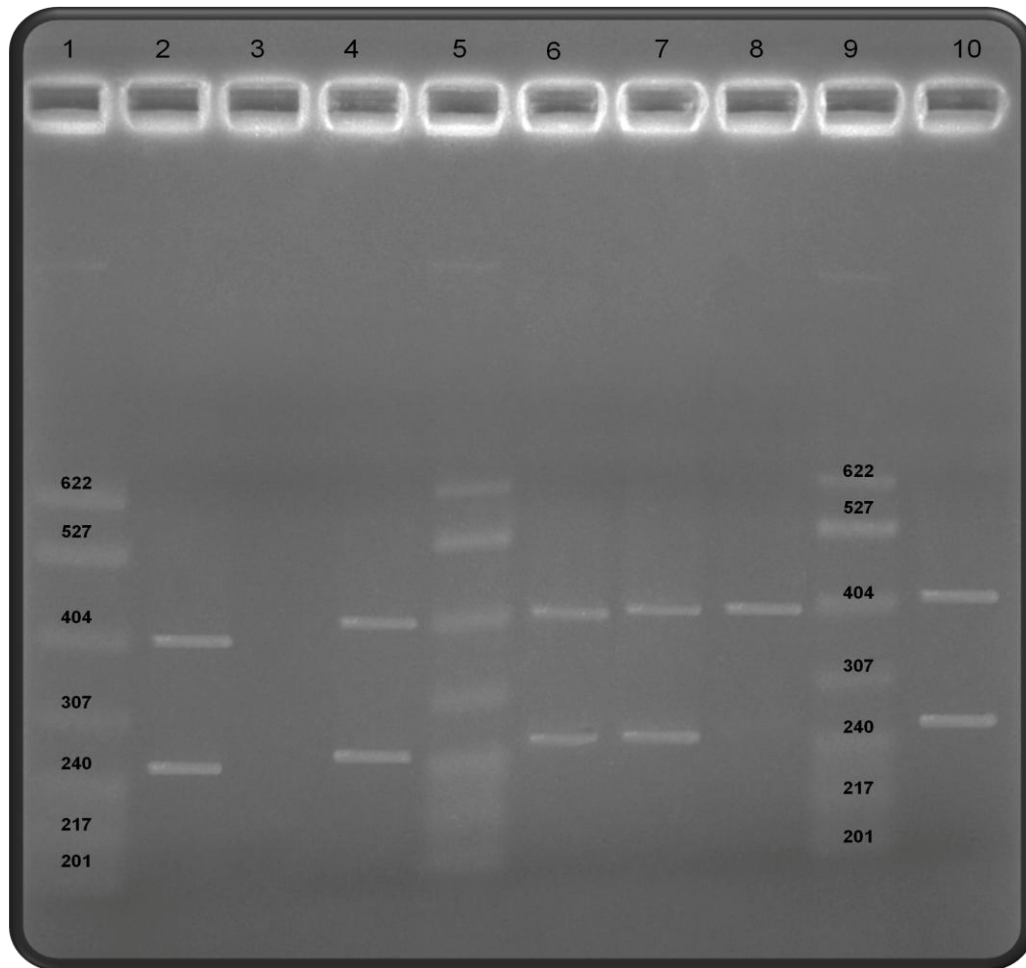
**Fig. 43.** Corte del amplicon de N1 con la enzima *Bsgl*



**Figura 43.** Enzima *Bsgl*. Amplicon de 754 pb de N1. Carril 1, 5 y 9 mpm pBR 322, carril 2 muestra (0), carril 3 muestra (1), carril 4 muestra (2), carril 6 muestra (20), carril 7 muestra (31), carril 8 muestra (49), Carril 10 muestra control positivo. La enzima realizó un corte, obteniéndose dos fragmentos de aprox. 500 pb y otro de 217 pb aprox.

Con la enzima *Bsgl*, el aislamiento viral A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 6) no generó un patrón de corte visible, indicando que dicha enzima realizó varios cortes en la secuencia por lo que no fue posible visualizarlo en el gel.

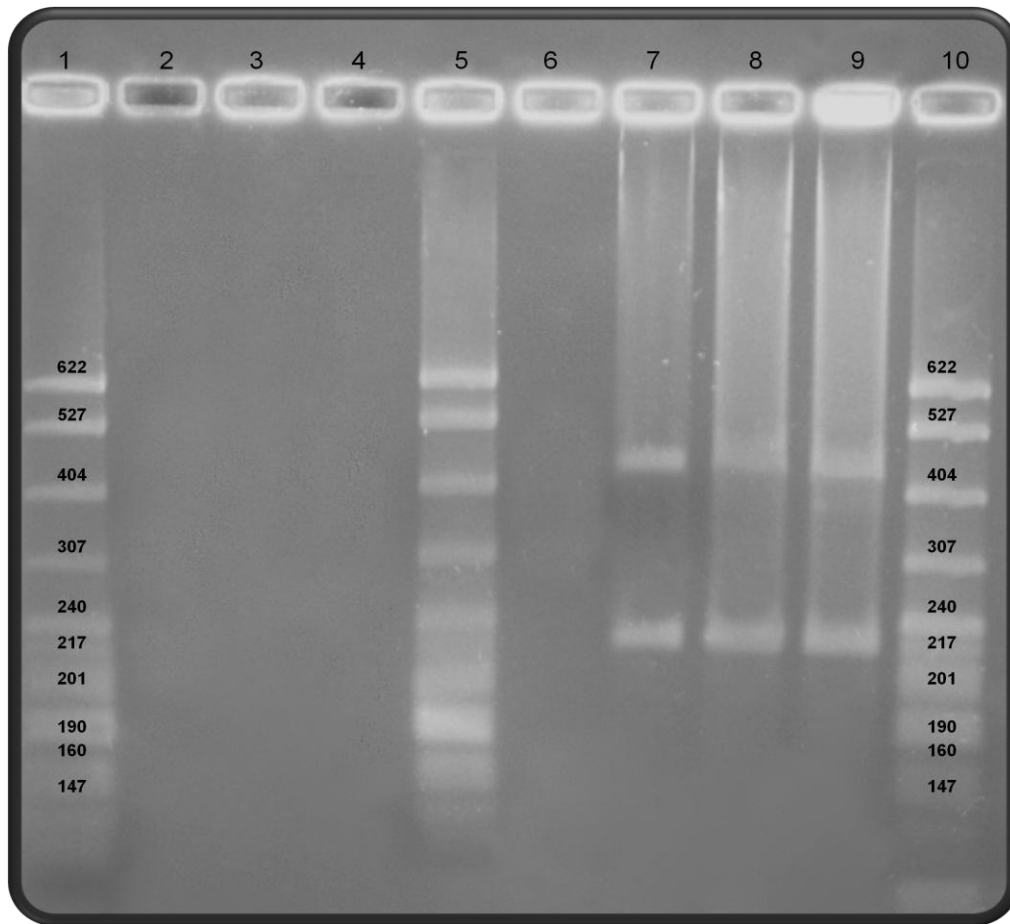
**Fig. 44.** Corte del amplicon de N1 con la enzima *HaeIII*



**Figura 44.** Enzima *HaeIII*. Amplicon de 754 pb de N1. Carril 1, 5 y 9, mpm pBR 322. Carril 2 muestra (0), carril 3 muestra (1), carril 4 muestra (2), carril 6 muestra (20), carril 7 muestra (31), carril 8 muestra (49), Carril 10 muestra control positivo. La enzima realizó un corte, obteniéndose dos fragmentos de 404 pb y otro de 240 pb aprox.

Con la enzima *HaeIII*, el aislamiento viral A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 3) no generó un patrón de corte visible.

**Fig. 45.** Corte del amplicon de N1 con la enzima *Hpa*II

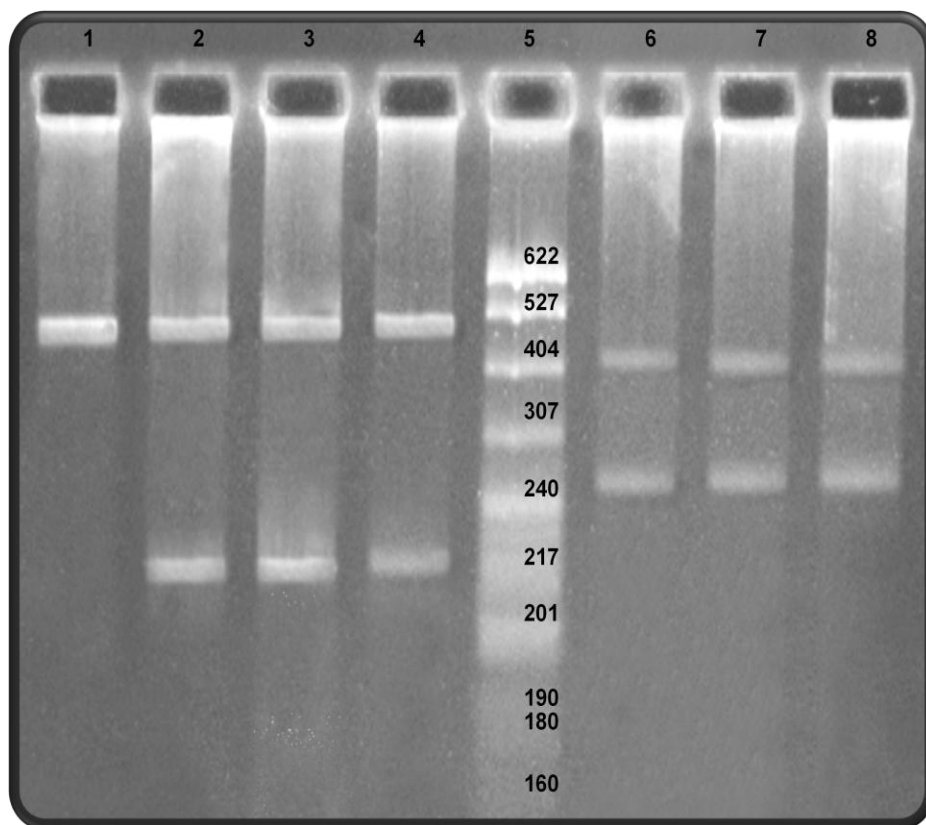


**Figura 45.** Enzima *Hpa*II. Amplicon de 754 pb de N1. Carril 1, 5 y 10 mpm pBR 322. Carril 2 muestra (0), carril 3 muestra (1), carril 4 muestra (2), carril 6 muestra (20), carril 7 muestra (31), carril 8 muestra (49), Carril 9 muestra control positivo. La enzima realizó un corte, obteniéndose dos fragmentos de aprox. 500 pb, y otro de 217 pb. Observándose dicho patrón en los carriles 7, 8 y 9.

Con la enzima *Hpa*II los aislamientos virales A/swine/Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 2), A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 3), A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 4), y A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 6), no mostraron un patrón de corte visible. Los demás aislamientos virales mostraron un patrón de corte esperado.



**Fig. 46.** Corte del amplicon de N1 con la enzima *Mbol*I



**Figura 46.** Enzima *Mbol*I. Amplicon de 754 pb de N1. Carril 5 mpm pBR 322. Carril 1 muestra (0), carril 2 muestra (1), carril 3 muestra (2), carril 4 muestra (20), carril 6 muestra (31), carril 7 muestra (49), Carril 8 muestra control positivo. La enzima realizó un corte, obteniéndose dos fragmentos. Carril 1–4 se obtuvieron 2 fragmentos de 527 pb, y otro de 217 pb aprox. Carril 6-8 se obtuvieron 2 fragmentos de 404 pb, y otro de 240 pb aprox.

Con la enzima *Mbol*I los aislamientos virales A/swine/Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 1), A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 2), A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, (carril 3), y A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 (carril 4), mostraron un patrón de corte diferente al esperado. Los aislamientos virales: A/swine/Veracruz 31/DMZC.FMVZ.UNAM/2010 y A/swine/Estado de México 49/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 tuvieron un patrón de corte similar al esperado de 471 y 283 pb.

---

## DISCUSIÓN

Las presentaciones pandémicas o epidémicas de la influenza humana y aviar a menudo causan grandes daños a la sociedad humana y la economía. <sup>(125)</sup>

La infección de influenza en cerdos con cepas de influenza provenientes de aves y humanos; aunados a la baja sintomatología que genera en esta especie, coloca al cerdo como un hospedero propicio para generar nuevas variantes virales patogénicas. Así, la influenza porcina adquiere proporciones de alto impacto desde un aspecto epidemiológico, pudiendo promover la generación de nuevas cepas virales de alta patogenicidad para el hombre. <sup>(13)</sup>

Se han descrito mutaciones en los ocho segmentos genómicos del virus de la influenza. <sup>(102) (104) (110)</sup> Dichas mutaciones la mayoría de las veces generan cepas virales que no son viables, pero en otras ocasiones dichas modificaciones caen en sitios estratégicos, tal es el caso de las mutaciones surgidas en sitios antigénicos como las proteínas de superficie, las cuales son reconocidas por anticuerpos previamente formados o por linfocitos T. <sup>(98) (99) (126)</sup> El resultado es la circulación de cepas inmunológicamente distintas, también conocidas como variantes antigénicas. <sup>(125)</sup>

Una variante antigénica es la adaptación o modificación que sufren algunos virus a la presión inmune y/o a fármacos antivirales, esto mediante la sustitución acumulada y gradual de aminoácidos en sitios antigénicos (comúnmente en HA y NA). <sup>(98) (99) (125)</sup>

Estudios anteriores han utilizado una variedad de métodos moleculares para detectar dichas variantes. Una técnica molecular simple y rápida desarrollada para conocer la composición del genotipo de los virus de la influenza A circulantes, es mediante el análisis por RT PCR RFLP's (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción). <sup>(122)</sup>

El ensayo de PCR seguido de una reacción enzimática fue utilizado para permitir un análisis rápido de los virus de influenza para identificar variantes que circularon

en México durante el periodo de septiembre del 2009 a febrero del 2011. Se realizó la digestión enzimática con 4 enzimas para amplicones de NA1 derivados del PCR, técnica con la que fue posible diferenciar cepas distintas en ese gen.

Hay gran cantidad de trabajos realizados con las enzimas de restricción para hacer caracterizaciones antigénicas sin llegar a hacer secuenciación de nucleótidos. Ellis JS, *et al.*, realizaron un estudio en Inglaterra en el periodo de 1995-1996 en la HA del H3N2. El análisis de restricción lo hicieron usando las enzimas *Bst*NI y *Hpa*II. Ellos encontraron que cuatro de 384 cepas virales mostraron evidencia de variación genética. <sup>(99)</sup> Coiras M, *et al.*, en el año 2010 en España realizaron un estudio similar al anterior, en la hemaglutinina del virus H3N2 de origen humano en España. Ellos utilizaron las enzimas de restricción *Bst*NI, *Hind*III, *Hpa*II y *Tru*9I, encontrando que la enzima de elección que permitió subdividir las cepas virales en 5 subgrupos antigénicos fue la enzima *Tru*9I. <sup>(98)</sup>

Offringa DP, *et al.*, realizaron un análisis para identificar los genotipos circulantes de los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza tipo A en el año 2000. En este estudio se utilizaron las enzimas de restricción *Afl*I y *Afl*II, para el segmento genómico PB1, *Bgl*II y *Bsa*I para PB2, *Bsr*GI y *Ava*I para PA, *Avr*I y *Acc*I para NP, *Dra*I y *Afl*II para M, *Afl*III y *Acc*I para NS. <sup>(121)</sup> La cepa viral del H1N1 conocida como A: Puerto Rico: 08:34 (PR8), comúnmente se utiliza con el propósito de producir vacunas seguras y eficaces en todo el mundo. La finalidad de este estudio fue evaluar modificaciones que pudieran haber aparecido en dicha cepa. <sup>(121)</sup>

Fehlmann EP, *et al.*, en el año 2005 en Chile hicieron un análisis para identificar la presencia de mutaciones en la proteína M2, <sup>(127)</sup> específicamente en la posición 31, sitio donde se encuentran los aminoácidos constituyentes del dominio transmembrana. <sup>(33) (107) (108) (109) (110)</sup> El análisis se realizó con la enzima *Scal*, la cual corta en dos fragmentos de 120 y 30 pb en las cepas salvajes, no así en presencia de dicha mutación antes descrita. <sup>(127)</sup>

---

Saito R, et al., realizaron un análisis similar al anterior, buscando mutaciones en la posición 31, a excepción de que además de la enzima *Scal*, utilizaron también las enzimas *BspLu11I* y *HhAI*.<sup>(107)</sup>

Guo L, et al., identificaron aislamientos con la presencia de mutaciones en la posición H274Y de NA, dicha mutación confiere resistencia al fármaco antiviral oseltamivir. El análisis de restricción se realizó usando la enzima *BspHI*. Con esta enzima se detectaron mutaciones en 24 cepas de un total de 39.<sup>(113)</sup>

En nuestro estudio, nosotros utilizamos las enzimas *BsgI*, *HaeIII*, *HpaII* y *MboII* para hacer la digestión a siete aislamientos virales que amplificaron para el gen N1. Se pudo observar que los patrones de corte generados por las enzimas *BsgI* y *HaeIII* no mostraron diferencias significativas con respecto al control positivo.

Con la enzima *BsgI*, el aislamiento viral A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 no generó un patrón de corte visible, indicando que dicha enzima realizó varios cortes en la secuencia por lo que no fue posible visualizarlo en el gel. Para el caso de la enzima *HaeIII* el aislamiento viral A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 tampoco generó un patrón de corte visible.

Con la enzima *HpaII* los aislamientos virales A/swine/Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 y A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 no mostraron un patrón de corte visible, indicando la presencia de cambios en la secuencia blanco de dicha enzima. Los demás aislamientos virales mostraron un patrón de corte esperado.

Con la enzima *MboII* los aislamientos virales A/swine/Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009, A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 y A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 mostraron un patrón de corte diferente al esperado de 471 y 283 pb.

## CONCLUSIONES

Se utilizó la técnica de RT PCR en Tiempo Real dirigido hacia el gen M, con el que se pudo confirmar que el virus se encontraba presente en las muestras de campo. De un total de 1246 muestras provenientes de rastro, 791 muestras resultaron positivas al virus de la influenza porcina, lo que representa una prevalencia del 63.48%, de estas muestras positivas se logró obtener un total de 33 aislamientos virales.

En este estudio se encontró la presencia del virus en muestras de semen y se logró el aislamiento viral a partir de esta muestra.

Se identificaron bandas de aproximadamente 100 pb, hallazgo que se ha reportado en varios sitios del mundo, en el que existe la presencia de recombinación genética entre genes de tipo porcino, humano y aviar en el gen M.

Yucatán y Campeche fueron los estados que resultaron negativos.

Se lograron resultados parciales mediante la seropositividad de los aislamientos virales provenientes de las muestras.

Con los oligonucleótidos de la tabla 6 se pudo diferenciar al virus de campo del virus vacunal. No hubo amplificación de este segmento para las muestras positivas de campo, lo que indica que los animales no fueron vacunados.

Once aislamientos virales de un total de treinta y tres resultaron positivos para el gen N1, 6 para H1N1 y 3 para H3N2, lo que representa un 33, 18 y 9% respectivamente. En el resto de las muestras no fue posible identificar amplicones para H1, H3, N1 y N2, lo que nos sugiere la presencia de variabilidad genética en los virus presentes en las muestras.

Se realizó la digestión enzimática a los siete amplicones de N1 con las enzimas: *BsgI*, *HaeIII*, *HpaII* y *MboII*. Los patrones de corte obtenidos con las diferentes enzimas fueron similares a los que se dilucidaron con el programa clone manager, excepto los patrones de corte obtenidos con la enzima *MboII*.

---

Se observó que con la enzima *MbolI* es posible identificar cepas con variaciones que caen en el sitio blanco de la enzima, obteniendo 4 cepas con diferencias en los patrones de corte de un total de 7.

Por lo tanto se puede concluir que el virus de la Influenza Porcina presenta variabilidad en los genes de la Hemaglutinina y la Neuraminidasa.

Es necesario y recomendable apoyarse de otras técnicas moleculares; como la secuenciación de nucleótidos y microarreglos para que junto con la digestión enzimática sea posible identificar las variantes que están circulando actualmente en la República Mexicana.

## REFERENCIAS

- (1) Zhang H. Tissue and host tropism of influenza viruses: importance of quantitative analysis. *Sci China C Life Sci.* 2009; 52(12):1101-10.
- (2) Stephenson I, Nicholson K G. Influenza: vaccination and treatment. *Eur Respir J*, 2001, 17: 1282—1293.
- (3) Nicholson K G, Wood JM, Zambon M. Influenza, *Lancet*, 2003, 362: 1733—1745.
- (4) Hinshaw, V S., Webster R G. The natural history of influenza A viruses, Basic and applied influenza research. CRC Press 1982.
- (5) Kawaoka, Y, Chambers T M, Sladen W L, Webster RG. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology* 1988, 163:247-250.
- (6) Webster R G, Bean WJ, Gorman O T, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56(1):152-79.
- (7) Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 1982, 215:1577-1585.
- (8) Steinhauser D, Holland J. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 198, 41:409-433.
- (9) Lakdawala SS, Lamirande EW, Suguitan AL Jr, Wang W, Santos CP. Eurasian-Origin Gene Segments Contribute to the Transmissibility, Aerosol Release, and Morphology of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *PLoS Pathog* 2011, 7 (12).
- (10) Rott R, Klenk H D, Scholtissek C. Correlation between structure and pathogenicity of myxoviruses. *Arzneimittelforschung.* 1977; 27(1B):208-12.

- 
- (11) Gramer M R. Defining swine influenza virus. *Journal of Swine Health and Production*, 2005; 13(3):157-160.
- (12) Robb NC, Smith M, Vreede F T, Fodor E. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol*. 2009, 90 (Pt 6):1398-407.
- (13) Cheung T K, Poon L L. Biology of influenza a virus. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1102: 1-25.
- (14) Steinhauer D A, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet*. 2002; 36:305-32.
- (15) Nayak D P, Hui E K, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*. 2004; 106(2):147-65.
- (16) Zambon M C. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 44 Suppl B:3-9.
- (17) Chen J, Lee K H, Steinhauer D A, Stevens D J, Skehel J J, Wiley D C. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*. 1998, 30;95(3):409-17.
- (18) Cross K J, Burleigh L M, Steinhauer D A. Mechanisms of cell entry by influenza virus. *Expert Rev Mol Med*. 2001, 6; 3(21):1-18.
- (19) De Vries R P, De Vries E, Bosch B J, de Groot R J, Rottier P J, de Haan C A. The influenza A virus hemagglutinin glycosylation state affects receptor-binding specificity. *Virology*. 2010, 20;403(1):17-25.
- (20) Berkhoff E G, Geelhoed-Mieras M M, Jonges M, Smith DJ, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. An amino acid substitution in the influenza A virus hemagglutinin associated with escape from recognition by human virus-specific CD4+ T-cells. *Virus Res*. 2007; 126(1-2):282-7.



- (21) Shortridge K F, Zhou N N, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti KG, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster R G. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology*. 1998, 20;252(2):331-42.
- (22) Gamblin S J, Skehel J J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*. 2010, 10; 285(37):28403-9.
- (23) García M, Crawford J M, Latimer J W, Rivera-Cruz E, Perdue ML. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol*. 1996; 77 (Pt 7):1493-504.
- (24) Saito T, Horimoto T, Kawaoka Y, Senne D A, Webster R G. Emergence of a potentially pathogenic H5N2 influenza virus in chickens. *Virology*, 1994, 201: 277-284.
- (25) Perdue M L, García M, Beck J, Swayne D E. An Arg-Lys insertion at the hemagglutinin cleavage site of an H5N2 avian influenza isolate. *Virus Genes*. 1996; 12(1):77-84.
- (26) Nakajima K. Influenza virus genome structure and encoded proteins. *Nippon Rinsho*. 1997 Oct; 55(10):2542-6.
- (27) Shi W, Lei F, Zhu C, Sievers F, Higgins DG. A Complete Analysis of HA and NA Genes of Influenza A Viruses. *PLoS One*. 2010, 5(12).
- (28) Xu X, Cox N J, Bender C A, Regnery H L, Shaw M W. Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. *Virology*. 1996; 224(1):175-83.
- (29) Maeda Y, Horimoto T, Kawaoka Y. Classification and genome structure of influenza virus. *Nippon Rinsho*. 2003; 61(11):1886-91.

- 
- (30) Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95(17):10224-8.
- (31) Ito T, Gorman O T, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol*. 1991; 65(10):5491-8.
- (32) Kitikoon P, Vincent A L, Janke B H, Erickson B, Strait E L, Yu S, Gramer M R, Thacker EL. Swine influenza matrix 2 (M2) protein contributes to protection against infection with different H1 swine influenza virus (SIV) isolates. *Vaccine*. 2009; 28(2):523-31.
- (33) Fehlmann E, Le Corre N, Abarca K, Godoy P, Montecinos L, Veloz A, Ferrés M. Search of amantadine-resistance in influenza A strains isolated in Santiago, Chile, 2001-2002. *Rev Chilena Infectol*. 2005, 22(2):141-6.
- (34) Berlin S, Qu L, Li X, Yang N, Ellegren H. Positive diversifying selection in avian Mx genes. *Immunogenetics*. 2008; 60(11):689-97.
- (35) Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, Hongo S. Influenza C Virus NS1 Protein Upregulates the Splicing of Viral mRNAs. *Journal of Virology* 2010, Vol. 84 (4):1957–1966
- (36) Gouarin S, Vabret A, Dina J, Petitjean J, Brouard J, Cuvillon-Nimal D, Freymuth F. Study of influenza C virus infection in France. *J Med Virol*. 2008, 80(8):1441-6.
- (37) Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. Evolution of the NS genes of the influenza A viruses. II. Characteristics of the amino acid changes in the NS1 proteins of the influenza A viruses. *Virus Genes*. 1990, 4(1):15-26.
- (38) O'Brien J D, She Z S, Suchard M A. Dating the time of viral subtype divergence. *BMC Evol Biol*. 2008, 8:172.

- (39) Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*. 1991, 182(2):475-85.
- (40) Forrest H L, Webster R G. Perspectives on influenza evolution and the role of research. *Anim Health Res Rev*. 2010, 11(1):3-18.
- (41) Russell R J, Kerry P S, Stevens D J, Steinhauer D A, Martin S R, Gamblin S J, Skehel J J. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(46):17736-41.
- (42) Osterhaus A D, Rimmelzwaan G F, Martina B E, Bestebroer T M, Fouchier R A. Influenza B virus in seals. *Science*. 2000, 288(5468):1051-3.
- (43) Kim Y H, Kim H S, Cho S H, Seo S H. Influenza B virus causes milder pathogenesis and weaker inflammatory responses in ferrets than influenza A virus. *Viral Immunol*. 2009 Dec;22(6):423-30.
- (44) Guo Y J, Jin F G, Wang P, Wang M, Zhu J M. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol*. 1983, 64 (Pt 1):177-82.
- (45) Manuguerra J C, Hannoun C. Natural infection of dogs by influenza C virus. *Res Virol*. 1992, 143(3):199-204.
- (46) Nerome K, Kanegae Y, Shortridge K F, Sugita S, Ishida M. Genetic analysis of porcine H3N2 viruses originating in southern China. *J Gen Virol*. 1995, 76 (Pt 3):613-24.
- (47) Gorman O T, Bean W J, Kawaoka Y, Webster R G. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol*. 1990, 64(4):1487-97.

- 
- (48) Lindstrom S, Endo A, Sugita S, Pecoraro M, Hiromoto Y, Kamada M, Takahashi T, Nerome K. Phylogenetic analyses of the matrix and non-structural genes of equine influenza viruses. *Arch Virol.* 1998; 143(8):1585-98.
- (49) Stech J, Xiong X, Scholtissek C, Webster RG. Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J Virol.* 1999, 73(3):1878-84.
- (50) Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 2000; 74:3–13.
- (51) Causey D, Edwards S V. Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *JID* 2008:197 (Suppl 1)29-33
- (52) Caron A, Gaidet N, de Garine-Wichatitsky M, Morand S, Cameron E Z. Evolutionary biology, community ecology and avian influenza research. *Infect Genet Evol.* 2009, 9(2):298-303.
- (53) Lebarbenchon C, Feare C J, Renaud F, Thomas F, Gauthier-Clerc M. Persistence of highly pathogenic avian influenza viruses in natural ecosystems. *Emerg Infect Dis.* 2010, 16(7):1057-62.
- (54) Qi X, Lu C. Swine influenza virus: Evolution mechanism and epidemic characterization. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2009, 49(9):1138-45.
- (55) Thiry E, Zicola A, Addie D, Egberink H, Hartmann K, Lutz H, Poulet H, Horzinek MC. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol.* 2007, 122(1-2):25-31.
- (56) Olsen C W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res.* 2002, 85 (2):199-210.
- (57) Becker W B. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa-1961. *J. Hyg. (Lond.)* 64, 309–320.

(58) Gaidet N, Cattoli G, Hammoumi S, Newman SH, Hagemeijer W, Takekawa JY, Cappelle J, Dodman T, Joannis T, Gil P, Monne I, Fusaro A, Capua I, Manu S, Micheloni P, Ottosson U, Mshelbwala JH, Lubroth J, Domenech J, Monicat F,. Evidence of infection by H5N2 highly pathogenic avian influenza viruses in healthy wild waterfowl. PLoS Pathog. 2008, 4(8).

(59) Yu H, Hua R H, Wei T C, Zhou Y J, Tian ZJ, Li G X, Liu TQ, Tong G Z. Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China. Vet Microbiol. 2008, 131(1-2):82-92.

(60) Wahlgren J, Waldenström J, Sahlin S, Haemig P D, Fouchier R A, Osterhaus A D, Pinhassi J, Bonnedahl J, Pisareva M, Grudin M, Kiselev O, Hernandez J, Falk KI, Lundkvist A, Olsen B. Gene segment reassortment between American and Asian lineages of avian influenza virus from waterfowl in the Beringia area. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008, (6):783-90.

(61) Makarova N V, Kaverin N V, Krauss S, Senne D, Webster R G. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. J Gen Virol. 1999, 80 (Pt 12):3167-71.

(62) Krauss S, Obert C A, Franks J, Walker D, Jones K, Seiler P, Niles L, Pryor S P, Obenauer J C, Naeve C W, Widjaja L, Webby R J, Webster R G. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. PLoS Pathog. 2007, 3(11):167.

(63) <http://www.generationaldynamics.com/cgi-bin/D.PL?xct=gd.e060303> (02-08-11, 09:52 a.m.)

(64) Van Epps HL. Influenza: exposing the true killer. J Exp Med. 2006, 203(4):803.

(65) Ma W, Kahn R E, Richt J A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. J Mol Genet Med. 2008, 3(1):158-66.

- 
- (66) Brown I H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs, *Vet. Microbiol.* 74 (2000), pp. 29–46.
- (67) Brown I H, Alexander D J, Chakraverty P, Harris P A, Manvell R J. Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Vet Microbiol.* 1994, 39(1-2):125-34.
- (68) Cong YL, Pu J, Liu QF, Wang S, Zhang GZ, Zhang XL, Fan WX, Brown EG, Liu JH. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China. *J Gen Virol.* 2007, 88 (Pt 7):2035-41.
- (69) Dong G, Luo J, Zhang H, Wang C, Duan M, Jude T, Louis Nolte D, Ji G, He H. Phylogenetic Diversity and Genotypical Complexity of H9N2 Influenza A Viruses Revealed by Genomic Sequence Analysis. *PLoS One.* 2011; 6(2)
- (70) Alexander I. Karasin, I, Brown H, Carman S, Olsen C. Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. *J Virol.* 2000, 74(19).
- (71) Karasin A I, West K, Carman S, Olsen C W. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(9):4349-54.
- (72) Tu J, Zhou H, Jiang T, Li C, Zhang A, Guo X, Zou W, Chen H, Jin M. Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol.* 2009; 154(5):887-90.
- (73) Payungporn S, Crawford P C, Kouo T S, Chen L M, Pompey J, Castleman W L, Dubovi E J, Katz J M, Donis R O. Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14(6):902-8.

(74) Karasin A I, Brown I H, Carman S, Olsen C W. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol.* 2000, 74(19):9322-7.

(75) Lipatov A S, Govorkova E A, Webby R J, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster R G. Influenza: emergence and control. *J Virol.* 2004, 78(17):8951-9.

(76) Moreno A, Barbieri I, Sozzi E, Luppi A, Lelli D, Lombardi G, Zanoni M G, Cordioli P. Novel swine influenza virus subtype H3N1 in Italy. *Vet Microbiol.* 2009, 138(3-4):361-7.

(77) Ma W, Vincent A L, Gramer M R, Brockwell C B, Lager K M, Janke B H, Gauger P C, Patnayak D P, Webby R J, Richt J A. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, 104(52):20949-54.

(78) Liu W, Wei M T, Tong Y, Tang F, Zhang L, Fang L, Yang H, Cao W C. Seroprevalence and genetic characteristics of five subtypes of influenza A viruses in the Chinese pig population: A pooled data analysis. *Vet J.* 2011, 187(2):200-6.

(79) Tognotti E. Influenza pandemics: a historical retrospect. *J Infect Dev Ctries.* 2009, 3(5):331-4.

(80) Ye J, Sorrell E M, Cai Y, Shao H, Xu K, Pena L, Hickman D, Song H, Angel M, Medina R A, Manicassamy B, Garcia-Sastre A, Pérez D R. Variations in the hemagglutinin of the 2009 H1N1 pandemic virus: potential for strains with altered virulence phenotype? *PLoS Pathog.* 2010, 6 (10).

(81) Morens D M, Taubenberger J K, Fauci A S. The 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus: What Next? *MBio.* 2010, 1(4).

(82) Berhane Y, Ojkic D, Neufeld J, Leith M, Hisanaga T, Kehler H, Ferencz A, Wojcinski H, Cottam-Birt C, Suderman M, Handel K, Alexandersen S, Pasick J. Molecular characterization of pandemic H1N1 influenza viruses isolated from

---

turkeys and pathogenicity of a human pH1N1 isolate in turkeys. *Avian Dis.* 2010, 54(4):1275-85.

(83) Chao D Y, Cheng K F, Li T C, Wu T N, Chen C Y, Tsai C A, Chen J H, Chiu H T, Lu J J, Su M C, Liao Y H, Chan W C, Hsieh Y H. Serological evidence of subclinical transmission of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus outside of Mexico. *PLoS One.* 2011, 6(1).

(84) Shinde V, Bridges C B, Uyeki T M, Shu B, Balish A, Xu X, Lindstrom S, Gubareva L V, Deyde V, Garten R J, Harris M, Gerber S, Vagasky S, Smith F, Pascoe N, Martin K, Dufficy D, Ritger K, Conover C, Quinlisk P, Klimov A, Bresee J S, Finelli L. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med.* 2009, 361(1):102.

(85) Chowell G, Echevarría-Zuno S, Viboud C, Simonsen L, Tamerius J, Miller M A, Borja-Aburto V H. Characterizing the epidemiology of the 2009 influenza A/H1N1 pandemic in Mexico. *PLoS Med.* 2011, 8(5).

(86) Nelli R K, Kuchipudi S V, White G A, Perez B B, Dunham S P, Chang K C. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res.* 2010, 6:4.

(87) Solovyov A, Palacios G, Briese T, Lipkin WI, Rabadan R. Cluster analysis of the origins of the new influenza A(H1N1) virus. *Eurosurveillance* Vol. 14, Issue 21.

(88) Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 2009, 459(7249):931-9.

(89) Lorusso A, Faaberg KS, Killian ML, Koster L, Vincent AL. One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples. *J Virol Methods.* 2010, 164(1-2):83-7.

(90) Vijaykrishna D, Poon L L, Zhu H C, Ma S K, Li O T, Cheung C L, Smith G J, Peiris J S, Guan Y. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science.* 2010, 328(5985):1529.



(91) Zepeda H M, Perea-Araujo L, Zarate-Segura P B, Vázquez-Pérez J A, Miliar-García A, Garibay-Orijel C, Domínguez-López A, Badillo-Corona J A, López-Orduña E, García-González O P, Villaseñor-Ruiz I, Ahued-Ortega A, Aguilar-Faisal L, Bravo J, Lara-Padilla E, García-Cavazos R J. Identification of influenza A pandemic (H1N1) 2009 variants during the first 2009 influenza outbreak in México City. *J Clin Virol.* 2010, 48(1):36-9.

(92) Lindblade K A, Arvelo W, Gray J, Estevez A, Frenkel G, Reyes L, Moscoso F, Moir J C, Fry A M, Olsen S J. A comparison of the epidemiology and clinical presentation of seasonal influenza A and 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Guatemala. *PLoS One.* 2010, 5(12).

(93) Aburto N J, Pevzner E, Lopez-Ridaura R, Rojas R, Lopez-Gatell H, Lazcano E, Hernández-Ávila M, Harrington T A. Knowledge and adoption of community mitigation efforts in México during the 2009 H1N1 pandemic. *Am J Prev Med.* 2010, 39(5):395-402.

(94) Löhr C V, DeBess E E, Baker R J, Hiett S L, Hoffman K A, Murdoch V J, Fischer K A, Mulrooney D M, Selman R L, Hammill-Black W M. Pathology and viral antigen distribution of lethal pneumonia in domestic cats due to pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *Vet Pathol.* 2010, 47(3):378-86.

(95) Cobey S, Pascual M, Dieckmann U. Ecological factors driving the long-term evolution of influenza's host range. *Proc Biol Sci.* 2010, 277 (1695): 2803-10

(96) Kida H, Shortridge K F, Webster R G. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology.* 1988, 162(1):160-6.

(97) Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Río Mde L, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res.* 2009, 40(8):643-54.

(98) Coiras MT, Aguilar JC, Galiano M, Carlos S, Gregory V, Lin YP, Hay A, Pérez-Breña P. Rapid molecular analysis of the haemagglutinin gene of human

---

influenza A H3N2 viruses isolated in Spain from 1996 to 2000. *Arch Virol.* 2001; 146: 2133–2147.

(99) Ellis J S, Sadler C J, Laidler P, Rebelo de Andrade H, Zambon M C. Analysis of Influenza A H3N2 Strains Isolated in England During 1995–1996 Using Polymerase Chain Reaction Restriction. *Journal of Medical Virology* 1997, 51:234–241.

(100) Gamblin S J, Haire L F, Russell R J, Stevens D J, Xiao B, Ha Y, Vasisht N, Steinhauer D A, Daniels R S, Elliot A, Wiley D C, Skehel J J. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science.* 2004, 303(5665):1838-42.

(101) Jia D, Rahbar R, Chan R W, Lee S M, Chan M C, Wang B X, Baker D P, Sun B, Peiris J S, Nicholls J M, Fish E N. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PLoS One.* 2010, 5(11).

(102) De Vries W, Haasnoot J, Fouchier R, de Haan P, Berkhout B. Differential RNA silencing suppression activity of NS1 proteins from different influenza A virus strains. *J Gen Virol.* 2009, 90(Pt 8):1916-22.

(103) Kwon Y J. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J.* 2010, 277(23):4814-27.

(104) Zhong W, Liu F, Dong L, Lu X, Hancock K, Reinherz EL, Katz J M, Sambhara S. Significant impact of sequence variations in the nucleoprotein on CD8 T cell-mediated cross-protection against influenza A virus infections. *PLoS One.* 2010, 5(5).

(105) Rimmelzwaan G F, Boon A C, Voeten J T, Berkhoff E G, Fouchier R A, Osterhaus A D. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res.* 2004, 103(1-2):97-100.

- (106) Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med.* 2002, 8(9):950-4
- (107) Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H. Detection of Amantadine-Resistant Influenza A Virus Strains in Nursing Homes by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis with Nasopharyngeal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 1 (40): 84–88.
- (108) Suzuki H, Saito R, Masuda H, Oshitani H, Sato M, Sato I. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J Infect Chemother* 2003, 9:195–200.
- (109) Hay A J, Kennedy N C, Skehel J J, Appleyard G. The matrix protein gene determines amantadine-sensitivity of influenza viruses. *J Gen Virol.* 1979, 42(1):189-91.
- (110) Bai G R, Chittaganpitch M, Kanai Y, Li YG, Auwanit W, Ikuta K, Sawanpanyalert P. Amantadine and oseltamivir resistant variants of influenza A viruses in Thailand. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009, 897–901.
- (111) Ferraris O, Escuret V, Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Morfin F. Role of neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza A virus infections. *Pathol Biol.* 2010, 58(2):69-78.
- (112) Monto A S, McKimm-Breschkin J L, Macken C, Hampson A W, Hay A, Klimov A, Tashiro M, Webster R G, Aymard M, Hayden F G, Zambon M. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, 50(7):2395-402.
- (113) Guo L, Garten R J, Foust A S, Sessions W M, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L V, Klimov AI, Xu X. Rapid identification of oseltamivir-resistant

---

influenza A(H1N1) viruses with H274Y mutation by RT-PCR/restriction fragment length polymorphism assay. *Antiviral Res.* 2009, 82(1):29-33.

(114) Lackenby A, Hungnes O, Dudman S G, Meijer A, Paget W J, Hay AJ, Zambon M C. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* 2008, 13(5).

(115) <http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/4043> (09-05-12, 18:10 p.m.)

(116) Jung T, Choi C, Chae C. Localization of swine influenza virus in naturally infected pigs. *Vet Pathol.* 2002, 39(1):10-6.

(117) Alcántar, P, Robles F, Chevez, J C. Experiencias en el análisis del valor del ct point (PCR tiempo real) para la Caracterización del virus de PRRS por medio de RFLP's. XLV Congreso Nacional AMVEC del 05 al 08 de Agosto del 2010, Acapulco, Guerrero.

(118) Ryabinin V A, Kostina E V, Maksakova G A, Neverov A A, Chumakov K M, Sinyakov A N. Universal oligonucleotide microarray for sub-typing of Influenza A virus. *PLoS One.* 2011, 6(4).

(119) Moulton K R, Taylor A W, Rowlen K L, Dawson E D. ampliPHOX Colorimetric Detection on a DNA Microarray for Influenza. *J Vis Exp.* 2011, (52).

(120) Ellis J S, Zambon M C. Molecular analysis of an outbreak of influenza in the United Kingdom. *European Journal of Epidemiology* 1997, 13: 369–372.

(121) Offringa D P, Tyson M V, Zhiping Y, Levandowski R A. A comprehensive systematic approach to identification of influenza A virus genotype using RT-PCR and RFLP. *Journal of Virological Methods* 2000, 88: 15–24.

(122) Cooper L A, Subbarao K. A Simple Restriction Fragment Length Polymorphism-Based Strategy That Can Distinguish the Internal Genes of Human H1N1, H3N2, and H5N1 Influenza A Viruses. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(7):2579-83.

(123) Cha T, Kao K, Zhao J, Mendelman M, Arvin A. Genotypic Stability of Cold-Adapted Influenza Virus Vaccine in an Efficacy Clinical Trial. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38 (2): 839–845.

(124) Aislamiento viral influenza porcina en embrión de pollo. Carpeta 9, Método de Prueba de Diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. FMVZ, UNAM. LTV-DPAC-MV-01-05.

(125) Huang JW, King CC, Yang JM. Co-evolution positions and rules for antigenic variants of human influenza A/H3N2 viruses. *BMC Bioinformatics*. 2009, 10 Suppl 1:S41.

(126) O'Donnell FT, Munoz FM, Atmar RL, Hwang LY, Demmler GJ, Glezen WP. Epidemiology and molecular characterization of co-circulating influenza A/H3N2 virus variants in children: Houston, Texas, 1997-8. *Epidemiol Infect.* 2003, 130(3):521-31

(128) Kilbourne ED, Schulman JL, Schild GC, Schloer G, Swanson J, Bucher D. Related studies of a recombinant influenza-virus vaccine. I. Derivation and characterization of virus and vaccine. *J Infect Dis.* 1971, 124(5):449-62.

(129) Baez M, Palese P, Kilbourne ED. Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *J Infect Dis.* 1980, 141(3):362-5

(127) Fehlmann E P, Le Corre P N, Abarca V K, Godoy M P, Montecinos P L, Veloz B A, Ferrés G M. Search of amantadine-resistance in influenza A strains isolated in Santiago, Chile, 2001-2002 *Rev Chil Infect* 2005; 22 (2): 141-146.

(130) Choi YJ, Nam HS, Park JS, Kim HJ, Park KB, Jeon MH, Kim CJ, Hwangbo Y, Park KS, Baek KA. Comparative analysis of the multiple test methods for the detection of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 virus. *J Microbiol Biotechnol.* 2010, 20(10):1450-6.

---

(131) Duan S, Boltz DA, Seiler P, Li J, Bragstad K, Nielsen L P, Webby R J, Webster R G, Govorkova E A. Oseltamivir-resistant pandemic H1N1/2009 influenza virus possesses lower transmissibility and fitness in ferrets. *PLoS Pathog.* 2010, 6 (7).

(132) Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med.* 2002, 8 (9):950-4.