



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA



ANÁLISIS *in silico* DE LA HEMOAGLUTININA Y  
NEURAMINIDASA DEL VIRUS DE  
INFLUENZA SUBTIPO H4N2

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

**ERIKA ORNELAS EUSEBIO**

Asesor:

MVZ, Dr. Gary García Espinosa

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá, mi hermano y mi abue.*

Mi FAMILIA, que con su apoyo, cariño y risas me han llevado de la mano hasta aquí... y lo que falta. Mamá, gracias por tu esfuerzo, tu dedicación y tu cariño, te quiero. ¡Lo logramos!

*A Jorge.*

Por tu apoyo, cariño y motivación. Gracias por estar sin importar el tiempo y la distancia, por motivarme a ser mejor persona cada día, por hacer cada día diferente y por tu cariñosa e invaluable paciencia. No olvidemos aquel instrumento musical, tratamiento de todo mal y ¡Feliz!...

*A Kolya.*

Mi compañera, mi guardiana y mi bebé, aunque sé que no puedes leer esto, espero que sepas lo importante que eres cada día, gracias por tus 10 años de vida y los que nos faltan por vivir.

## **AGRADECIMIENTOS**

***A la UNAM.***

Mi alma máter.

***Al Dr. Gary García Espinosa***

Por su confianza y apoyo para la realización de este trabajo.

***A Fernando Chávez Maya***

Por tus enseñanzas, opiniones, consejos y sobre todo críticas.

***A Odi, Marce, Pablito, Debbie y Memo.***

Por todas las desveladas, risas y experiencias que compartimos, gracias, hicieron muy divertidos estos años.

***A Ana y a Beto***

Por su apoyo, sus sonrisas y su sazón.

***A Arturo Hernández Colina***

Por tu apoyo, consejos, opiniones, amistad y sobre todo por compartir el gusto por las aves.

***A Ari, Nei, Brenda, Mariana, Paty, Lalo, Lupita, Isa y todas las personas que llevo en mi mente y alma y que, sin lugar a duda, han dejado huella.***

***Al jurado.***

Por la revisión de esta tesis y sus valiosas observaciones.

***Al proyecto PAPIIT IN216212.*** Caracterización del genoma de virus de Influenza aviar de pollo y pato. Responsable Gary García Espinosa, por el financiamiento otorgado.

***“Todo parece imposible hasta que se hace”***  
***Nelson Mandela***

## CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| RESUMEN .....   | 1      |
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 2      |
| 1.1 Características del virus de Influenza y su genoma .....  | 2      |
| 1.2 Ecología del virus: las aves acuáticas como reservorios y su participación como transmisoras del virus de Influenza Aviar ..... | 3      |
| 1.3 Implicación del virus en salud pública y en avicultura .....  | 6      |
| 1.4 Aspectos evolutivos del virus de Influenza Aviar .....  | 8      |
| 1.5 La Hemoaglutinina y la Neuraminidasa .....  | 10     |
| 1.6 Mutaciones .....  | 11     |
| 1.7 Análisis <i>in silico</i> de secuencias .....   | 13     |
| II. JUSTIFICACIÓN .....   | 14     |
| III. HIPÓTESIS .....  | 15     |
| IV. OBJETIVOS .....   | 15     |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS .....   | 17     |
| 5.1 Virus .....   | 17     |
| 5.1.1 Obtención de las secuencias nucleotídicas de la Hemoaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) .....                                | 17     |
| 5.2 Secuencias similares .....  | 17     |
| 5.3 Secuencias utilizadas para el análisis filogenético .....   | 18     |
| 5.4 Análisis filogenético .....   | 18     |
| 5.5 Traducción de las secuencias .....  | 19     |
| 5.6 Identificación del sitio de corte .....   | 19     |
| 5.7 Identificación de los sitios de glicosilación y del sitio de unión a receptores .....   | 19     |
| 5.8 Reconocimiento del dominio hidrofóbico en la NA .....   | 20     |
| 5.9 Identificación de mutaciones asociadas a resistencia contra fármacos inhibidores de la Neuraminidasa .....                      | 20     |
| 5.10 Modelos tridimensionales de las proteínas HA y NA .....  | 21     |

## IV

|  |    |
|--|----|
| VI. RESULTADOS.....  | 22 |
| 6.1 Secuencias similares.....  | 22 |
| 6.2 Cálculo del número de diferencias y de las distancias genéticas entre las<br>secuencias.....   | 29 |
| 6.3 Construcción de los árboles filogenéticos.....   | 31 |
| 6.4 El sitio de corte en la Hemoaglutinina.....  | 36 |
| 6.5 Identificación de los sitios de glicosilación y del sitio de unión a receptores<br>en la Hemoaglutinina.....   | 38 |
| 6.6 Análisis de la Neuraminidasa y reconocimiento del dominio hidrofóbico<br>en su estructura.....   | 41 |
| 6.7 Identificación de mutaciones que confieren resistencia a fármacos antivirales<br>en la NA.....   | 42 |
| 6.8 Modelos tridimensionales de las proteínas HA y NA.....   | 43 |
| <br>   |    |
| VII. DISCUSIÓN.....  | 51 |
| <br>   |    |
| VIII. CONCLUSIONES.....  | 62 |
| <br>   |    |
| IX. REFERENCIAS.....   | 63 |
| <br>   |    |
| X. ANEXOS.....   | 70 |
| I. Secuencias utilizadas para realizar el análisis filogenético del segmento 4,<br>obtenidas de acuerdo a la disponibilidad en GenBank y con los criterios<br>establecidos en la metodología.  |    |
| II. Secuencias utilizadas para realizar el análisis filogenético del segmento 6,<br>obtenidas de acuerdo a la disponibilidad en GenBank y con los criterios<br>establecidos en la metodología. |    |
| III. Claves de las secuencias incluidas en los cálculos de distancias genéticas<br>para el segmento 4 y el segmento 6.   |    |
| IV. Distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos del segmento 4.   |    |
| V. Distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos del segmento 6.  |    |

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Porcentaje de identidad nucleótido-nucleótido obtenido al hacer alineamientos pareados utilizando el programa BLAST, con la secuencia del segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) y las secuencias disponibles en el banco de genes.....                   | 22 |
| Cuadro 2. Porcentaje de identidad nucleótido-nucleótido obtenido al hacer alineamientos pareados utilizando el programa BLAST, con la secuencia del segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) y las secuencias disponibles en el banco de genes.....                   | 26 |
| Cuadro 3. Estimación de la divergencia evolutiva de las secuencias dentro de los grupos (a) y entre ellos (b) designados de acuerdo a la topología del dendrograma del segmento 4.....  | 35 |
| Cuadro 4. Estimación de la divergencia evolutiva de las secuencias dentro de los grupos (a) y entre ellos (b) designados de acuerdo a la topología del dendrograma del segmento 6.....  | 35 |
| Cuadro 5. Comparación de los aminoácidos presentes en el sitio de unión a receptores de la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con las secuencias consenso representativas de los virus aislados en América del Norte y aquellos aislados en Europa, Asia u Oceanía..... | 39 |
| Cuadro 6. Virus de Influenza aviar utilizados para la comparación de sus respectivas Neuraminidasas.....  | 41 |
| Cuadro 7. Mutaciones en la NA asociadas a resistencia.....  | 42 |
| Cuadro 8. Comparación entre las características de la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) y del virus A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) de alta patogenicidad.....  | 45 |
| Figura 1. Ciclo de transmisión del virus de Influenza Aviar entre las poblaciones de aves acuáticas silvestres.....   | 5  |
| Figura 2. Porcentaje de similitud (a) y número de secuencias similares (b) por especie al comparar la secuencia del segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con aquellas disponibles en el banco de genes, utilizando el programa BLAST.....                         | 24 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 3. Porcentaje de similitud (a) y número de secuencias similares (b) por especie al comparar la secuencia del segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con aquellas disponibles en el banco de genes, utilizando el programa BLAST.....  | 28 |
| Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias del segmento 4.....   | 32 |
| Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias del segmento 6.....   | 33 |
| Figura 6. Comparación de los aminoácidos que están en el péptido conector y sitio de corte de la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), las secuencias consenso del grupo de virus de origen norteamericano y euroasiático y la secuencia de un virus de alta patogenicidad A/chicken/Queretaro/14588-19/1994 (H5N2)..... | 37 |
| Figura 7. Identificación en la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) del péptido conector, sitio de corte, sitios de glicosilación, sitio de unión a receptores y Tirosina en la posición 174.....  | 40 |
| Figura 8. Comparación de una parte de la secuencia de aminoácidos presentes en el dominio hidrofóbico de la NA entre dos virus de alta patogenicidad y el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).....   | 42 |
| Figura 9. Diagramas de Ribbon de uno de los 3 monómeros que conforman la HA previo al corte proteolítico de los virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) (a) y A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) (b).....  | 44 |
| Figura 10. Diagrama de Ribbon que muestra al homotrímero HA <sub>0</sub> del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).....  | 45 |
| Figura 11. Vistas laterales de la estructura tridimensional de un monómero de la HA <sub>0</sub> de los virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) (a, b) y A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) (c, d).....  | 46 |
| Figura 12. Vista superior del modelo tridimensional del homotrímero HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).....  | 47 |
| Figura 13. Vista lateral del modelo tridimensional del homotrímero HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).....   | 48 |
| Figura 14. Diagrama de Ribbon que muestra al homotetrámero NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).....   | 49 |
| Figura 15. Vista lateral (a) e inferior (b) del modelo tridimensional de la NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).....  | 50 |

## RESUMEN

ORNELAS EUSEBIO ERIKA. Análisis *in silico* de la Hemoaglutinina y Neuraminidasa del virus de Influenza subtipo H4N2 (bajo la dirección de: MVZ, Dr. Gary García Espinosa).

A finales de la temporada migratoria de patos silvestres en el año 2011, en el Estado de México, se aisló un virus de influenza tipo A (VIA) a partir de agua que fue identificado como A/ambiente/México/2011 (H4N2) por el laboratorio de la CPA. El VIA H4N2 es uno de los subtipos con mayor prevalencia en patos silvestres de América del Norte y en raras ocasiones también puede presentarse en pollos, pavos y psitácidos. Este subtipo es considerado de baja virulencia y no es de notificación obligatoria. Las aves acuáticas silvestres de los órdenes *Anseriformes* y *Charadriiformes* se consideran el principal reservorio de los VIA y su comportamiento migratorio es considerado un mecanismo de diseminación.

El objetivo de este trabajo fue determinar el linaje genético, la potencial patogenicidad e identificar posibles mutaciones asociadas a resistencia contra antivirales del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), a través del análisis *in silico* de la Hemoaglutinina y Neuraminidasa.

Para realizar el análisis filogenético, se incluyeron secuencias del VIA subtipo H4N2 aislados en América del Norte y en Europa, Asia y Oceanía; se construyó un dendrograma para la HA y otro para la NA, con el algoritmo Neighbor-Joining. Se utilizaron herramientas de bioinformática para traducir las secuencias e identificar en la HA el sitio de corte, los sitios de glicosilación, el sitio de unión a receptores, y en la NA, el dominio hidrofóbico, así como alguna mutación asociada a resistencia contra antivirales. Se obtuvieron los modelos tridimensionales de la HA y NA, para identificar en ellos las regiones señaladas y se compararon con modelos de virus de alta patogenicidad.

El análisis filogenético indica que el virus estudiado está más cercanamente relacionado con los virus de América del Norte y más alejado del linaje Euroasiático. Debido a las características del sitio de corte, de los sitios de glicosilación de la HA y del dominio hidrofóbico de la NA, el virus presenta un fenotipo de baja virulencia y no presenta ninguna mutación asociada a resistencia contra antivirales.

**Palabras clave: análisis *in silico*, virus de influenza, hemoaglutinina, neuraminidasa, H4N2.**



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Características del virus de Influenza y su genoma

El agente etiológico de la enfermedad de Influenza Aviar está clasificado de acuerdo al Comité Internacional en Taxonomía de los Virus (ICTV por sus siglas en inglés), en su reporte de 2011, dentro de la familia Orthomyxoviridae la que incluye 5 géneros, de los cuales uno corresponde a Influenzavirus tipo A, <sup>1</sup> mismo que se subdivide en subtipos de acuerdo a la naturaleza antigénica de sus glicoproteínas de membrana principales: la Hemoaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA), que se proyectan desde la superficie del virión y que son codificadas por los segmentos del genoma viral 4 y 6 respectivamente.<sup>1,2</sup> Actualmente se reconocen 16 alelos que codifican para la HA (H1-H16) y 9 alelos que codifican para la NA (N1-N9), <sup>3</sup> recientemente se identificó un novedoso virus de influenza tipo A en murciélagos proveniente de Guatemala, dando lugar al subtipo H17N10. <sup>4</sup>

El virus de Influenza A mide entre 80 a 120 nm, tiene forma esférica, pleomórfica o filamentosa que incluso llega a medir 300 nm de longitud. Su estructura externa se caracteriza por tener una membrana fosfolipídica donde se insertan tres proteínas virales: las glicoproteínas HA, NA y en menor proporción la proteína transmembranal M2, mientras que en la parte interna se encuentra una capa de la proteína M1 que encierra al ácido nucleico asociado a la Nucleoproteína (NP), así como el resto de las proteínas que se encuentran en menor cantidad. <sup>3,5</sup>

El genoma del virus está formado por una cadena de ARN de polaridad negativa que está dividida en 8 segmentos que varían en longitud desde 890 nucleótidos (nt) hasta 2,350 nt aproximadamente. En total, el genoma consiste en alrededor de 13,600 nt que

codifican para 11 proteínas virales, <sup>3,5</sup> de las cuales 9 son constitutivas o estructurales del virus, y son: el complejo de polimerasas virales, constituido por la proteína PB2 codificada por el segmento 1, la proteína PB1 y en ocasiones la PB1-F2, <sup>3</sup> ambas codificadas por el segmento 2 y la proteína PA codificada por el segmento 3; la glicoproteína Hemoaglutinina codificada por el segmento 4, la Nucleoproteína (NP) que es la mayor proteína estructural del virus codificada por el segmento 5, la glicoproteína Neuraminidasa codificada por el segmento 6 y las proteínas de Matriz M1 y M2 codificadas por el segmento 7; finalmente las dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) que son codificadas por el segmento 8. <sup>2,5</sup>

## 1.2 Ecología del virus: las aves acuáticas como reservorios y su participación como transmisoras del virus de Influenza Aviar

El rango completo de hospedadores del virus de Influenza Aviar aún no se conoce en su totalidad, con base a numerosos estudios y muestreos se ha determinado que al menos 105 especies de las más de 9,000 conocidas albergan al virus, <sup>6</sup> sin embargo, hay dos órdenes de aves, reservorios naturales de todos los virus de Influenza tipo A: el orden *Anseriformes* (patos, gansos y cisnes) y el orden *Charadriiformes* (gaviotas, vuelvepedras, charranes). <sup>5,6</sup>

El primer reporte de infección por el virus de Influenza en aves acuáticas silvestres data de 1961, <sup>7</sup> el siguiente hallazgo proviene de un monitoreo serológico desde 1968 hasta 1972, en el que se encontraron anticuerpos en 21 especies de aves silvestres en diferentes regiones geográficas, <sup>6</sup> lo anterior confirma que las aves silvestres están continuamente expuestas al virus y sugiere su participación potencial como reservorios. Actualmente, esta hipótesis ha sido corroborada por los numerosos estudios a través del tiempo en los que se

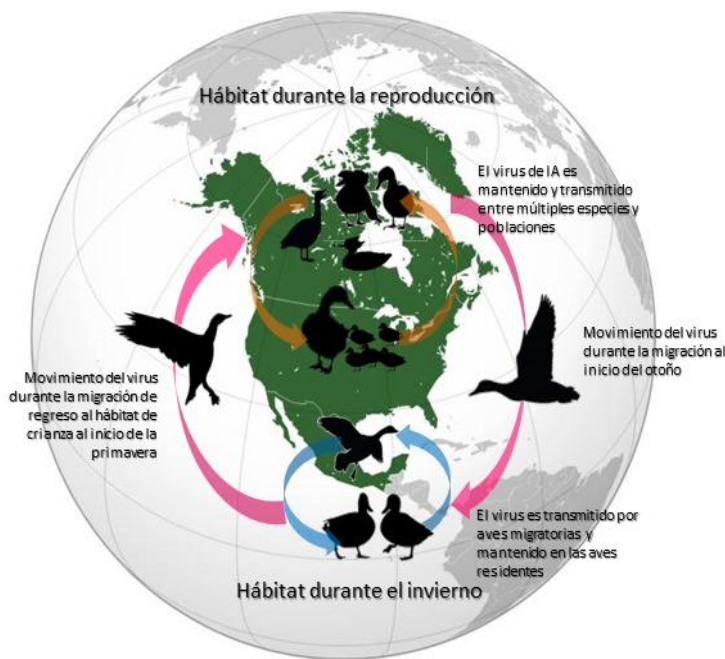
han aislado todos los subtipos conocidos del virus de Influenza A, a partir de aves silvestres pertenecientes, en su mayoría, a los órdenes *Anseriformes* y *Charadriiformes*.<sup>6</sup>

La transmisión del virus de Influenza Aviar entre poblaciones de aves silvestres es horizontal a través de la ruta fecal-oral, involucrando agua contaminada con el virus dentro de sus hábitats. En los patos, la replicación ocurre de manera primaria en el tracto intestinal con una alta concentración de partículas virales infectantes excretadas en heces, que puede durar hasta 28 días pos-infección;<sup>6</sup> no obstante, la persistencia de este es extremadamente limitada, en general, los virus de Influenza Aviar son estables a un pH entre 7.4 a 8.2, a baja temperatura (< 17°C) y con una concentración de sales inversamente proporcional a su presencia.<sup>8</sup>

Se ha demostrado que la prevalencia del virus en las aves acuáticas en el norte de Estados Unidos y sur de Canadá, incrementa durante el otoño alcanzando el 30%, principalmente en aves juveniles pertenecientes a la subfamilia *Anatinae*, tales como el pato de collar (*Anas platyrhynchos*), el pato golondrino (*Anas acuta*) y las cercetas (*Anas discors*, *Anas crecca*, entre otras), mientras que ocurre una menor incidencia de infecciones en el orden *Charadriiformes*.<sup>6</sup>

Aún no está claro cómo el virus de Influenza se mantiene durante un año en la naturaleza, sin embargo la evidencia encontrada en estudios realizados en anátidos y sus hábitats sugiere que el mantenimiento del virus está basado en la combinación de dos factores: la transmisión horizontal de manera directa por contacto ave a ave y la persistencia del virus en el ambiente.<sup>6,8</sup> Teniendo en cuenta el comportamiento migratorio de algunas especies de aves acuáticas y la ecología del virus, se puede explicar el ciclo de transmisión del virus de la siguiente forma (figura 1):

- I. El virus de Influenza A es mantenido y transmitido entre múltiples especies y poblaciones de aves que comparten el mismo hábitat.
- II. El comportamiento migratorio de las aves de norte a sur al inicio del otoño conlleva el movimiento del virus con ellas y por lo tanto contribuyen al ciclo de transmisión dentro del continente.
- III. El virus es transmitido de las aves migratorias a las aves residentes debido a la interacción entre ellas, y puesto que la transmisión de los virus de Influenza aviar es dependiente de la ruta fecal-oral, se ha propuesto que esto conlleva a la contaminación de cuerpos de agua y en algunos casos dependiendo de las condiciones hidrológicas, a la persistencia del virus en el ambiente.
- IV. Al regresar a su hábitat de crianza al inicio de la primavera, las aves migratorias transportan al virus de sur a norte, aunque se ha visto que la prevalencia de la infección en estas aves por el virus en esta temporada del año puede ser tan baja como 1 o 2 %.<sup>6,8</sup>



**Figura 1. Ciclo de transmisión del virus de Influenza Aviar entre las poblaciones de aves acuáticas silvestres. [Imagen del autor]**

América del Norte cuenta con una gran cantidad de aves migratorias y residentes, entre las que destacan por su importancia económica y el número de individuos las pertenecientes a la familia *Anatidae*, de las cuales, se estima que entre el 7 y el 17% arriba a México durante su migración al inicio del periodo invernal, mezclándose con las poblaciones de anátidos residentes que permanecen relativamente constantes a lo largo del año.<sup>9</sup>

En México, la distribución de las aves acuáticas depende de las características, calidad y extensión de los humedales, por lo que se tienen áreas que albergan bajas y altas concentraciones de ejemplares. Se calcula que de los 28 humedales prioritarios para México, 7 están ubicados en la región del Altiplano mexicano, y que en conjunto estos humedales albergan al 10.7% de las aves migratorias; con una distribución aproximada de 27% de pato golondrino (*Anas acuta*), 25% de pato calvo (*Anas americana*), 20% de cerceta de alas verdes (*Anas crecca*), 11% de pato cucharón (*Anas clypeata*), 7% de cerceta alas azules (*Anas discors*), 7% de pato mexicano (*Anas platyrhynchos diazi*) y finalmente el 3% de pato pinto (*Anas strepera*);<sup>9</sup> siendo éstas, algunas de las especies de patos en donde más se han aislado y posteriormente secuenciado los virus de Influenza tipo A alrededor del mundo.

### 1.3 Implicación del virus en salud pública y en avicultura

La mayoría de las infecciones por el virus de Influenza Aviar no presentan signología o resultan en una enfermedad localizada en el tracto respiratorio y digestivo de las aves,<sup>10</sup> lo cual sugiere que son ocasionadas por cepas de baja patogenicidad que han coevolucionado con sus hospedadores. Sin embargo, ocasionalmente virus altamente

virulentos que provocan una enfermedad aguda y sistémica, con altos rangos de mortalidad, aparecen en la naturaleza y causan brotes severos pero auto-limitantes y que provocan grandes pérdidas para la avicultura.<sup>5,10</sup>

Históricamente sólo los subtipos H5 y H7 han ocasionado brotes de Influenza Aviar de alta patogenicidad en aves domésticas, sin embargo la mayoría de los virus H5 o H7 son considerados no patogénicos, a pesar de ello, y debido a la constante variación en su patogenicidad muchos países han establecido lineamientos para el control de infecciones en aves domésticas ocasionadas por estos subtipos, así como su reporte obligatorio.<sup>6</sup>

De acuerdo a la Organización Mundial de Sanidad Animal, en su capítulo 10.4 del Código Sanitario para los Animales Terrestres, la influenza aviar de declaración obligatoria es una infección de las aves de corral causada por cualquiera de los virus de influenza aviar de tipo A perteneciente a los subtipos H5 o H7 o por cualquiera de los virus de influenza aviar con un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) superior a 1.2 (o que cause mortalidad en al menos el 75% de los casos).<sup>11</sup>

También es importante determinar el potencial de patogenicidad de los virus H5 y H7 mediante la secuenciación de los aminoácidos presentes en el sitio de corte, tal y como se demostró en el brote de Influenza Aviar ocurrido entre 1983 y 1984 en aves domésticas en Pennsylvania y estados circundantes, en los que al analizar aislamientos de alta y baja patogenicidad derivados del brote se muestra que ambos virus tienen perfiles de aminoácidos básicos en el sitio de corte de la Hemaglutinina; no obstante una mutación en los virus considerados de baja patogenicidad fue la responsable en el cambio de patogenicidad, que resultó en la pérdida de una cadena lateral de carbohidratos cerca del sitio de corte (haciendo más accesible el sitio a endoproteasas intracelulares).<sup>10</sup>

Por otro lado, se ha demostrado que los virus de Influenza Aviar pueden infectar y replicarse en una amplia variedad de especies incluyendo: pollos, pavos, cerdos, caballos, humanos y en una gran variedad de otras especies de aves y mamíferos; sin embargo, la cantidad de virus requerida para infectar al hospedador tiene variaciones dependiendo del grado de adaptación al hospedador. Cuando el virus comienza a adaptarse al nuevo hospedador, es menos probable que se replique en el hospedador original y si el virus circula el tiempo suficiente en este nuevo hospedador, se genera un nuevo linaje.<sup>6</sup>

La regla general de que el virus de influenza adaptado al hospedador se queda dentro de una misma especie o especies relacionadas tiene sus excepciones, como claros ejemplos están el subtipo H1N1 original de cerdos que constantemente cruza la barrera de especie a pavos y recientemente en 2009 a humanos, originando una pandemia, que de acuerdo a un comunicado de la OMS-OPS del 4 de mayo de 2009, 20 países habían notificado oficialmente 985 casos de infección por el virus, 590 de los cuales habían sido notificados y confirmados en México, 25 de ellos mortales;<sup>12</sup> asimismo los subtipos H5N1, H7N7, H7N3 y H9N2 provenientes de aves domésticas han sido considerados como patógenos zoonóticos pero con un riesgo considerado bajo.<sup>6</sup>

#### 1.4 Aspectos evolutivos del virus de Influenza Aviar

Los virus ARN constituyen las entidades biológicas con la mayor tasa de mutación, característica que se cree ha evolucionado como parte natural de su ciclo de replicación, lo que le permite evadir la respuesta inmune de su hospedador o bien adaptarse de forma más rápida a este.<sup>2</sup> Esta es la razón por la que los virus de Influenza tipo A han sido capaces de adaptarse y circular en muchas especies de mamíferos y aves. Esta tasa de mutación se

atribuye al complejo de ARN polimerasas virales, que son propensas a errores debido a que no tienen actividad exonucleasa, es decir no corrigen errores al momento de copiar las secuencias de nucleótidos, a diferencia de las ADN polimerasas. Este proceso de producción de errores origina la continua obtención de poblaciones de quasiespecies de virus ARN que nunca serán genéticamente homogéneas y que son seleccionadas de la población mayoritaria por alguna presión ambiental selectiva.<sup>3,13</sup>

Otro factor importante inherente a la evolución del virus, además de la mutación es la recombinación genética, que consiste en la producción de nuevas combinaciones de secuencias de nucleótidos resultado de un intercambio físico del material genético.<sup>14</sup> Para ambos casos, se han reportado previamente virus de Influenza Aviar en los que una mutación incrementa su virulencia, como fue el caso de los aislamientos A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2), A/Chicken/Mexico/94 (H5N2), A/Chicken/Netherlands/2003 (H7N7) y A/Chicken/Canada/2004 (H7N3),<sup>15</sup> o bien, mediante recombinación intragénica cuando ocurre una co-infección de diferentes subtipos; por ejemplo, el subtipo H5N1 en Asia, o el H1N1 en América del Norte.<sup>16</sup>

La evolución del virus en los órdenes de aves *Anseriformes* y *Charadriiformes* parece ser lenta con respecto a la ocurrida en aves domésticas, seres humanos y otros mamíferos, manteniendo sus genes muy conservados a nivel de aminoácidos, asimismo mediante numerosos estudios filogenéticos se puede apreciar una clara separación entre los virus aislados de Europa, Asia, África y Australia, que juntos conforman el linaje Euroasiático, de aquellos virus aislados en América del Norte y América del Sur que conforman el linaje Americano; sin embargo, existe la excepción donde un virus puede compartir material genético entre continentes o regiones geográficas diferentes.<sup>5,6</sup>



## 1.5 La Hemoaglutinina y la Neuraminidasa

Las proteínas de mayor interés y objeto de numerosas investigaciones han sido la HA y la NA, la primera por su utilidad en estudios filogenéticos, diagnóstico, desarrollo de vacunas y determinación de virulencia y patogenicidad, mientras que la segunda proteína tiene especial interés para el desarrollo de fármacos antivirales, así como también para estudios filogenéticos.

La HA es la proteína que tiene la función de unir la partícula viral a los receptores de ácido siálico en la superficie de las células, siendo la responsable de la penetración y liberación de la nucleocápside viral al citoplasma celular, por otro lado, la Neuraminidasa tiene la actividad de remover el ácido siálico de los receptores celulares para que los nuevos viriones producidos no formen agregados en la superficie de la célula y puedan ser liberados además de removerlo también de la HA para que los viriones no se agreguen entre ellos; ambas son proteínas específicas de cada subtipo y funcionan como los principales determinantes antigénicos para los cuales los anticuerpos neutralizantes son producidos.<sup>2,5</sup>

La HA es sintetizada inicialmente como un polipéptido precursor llamado HA<sub>0</sub>, asociada de forma no covalente como un homotrímero. Esta HA<sub>0</sub> precursora es cortada en una Arginina (R) conservada para dar origen a dos subunidades: HA<sub>1</sub> y HA<sub>2</sub>, ambas están unidas por medio de un sólo enlace disulfuro.<sup>17</sup> Este corte es necesario para la infectividad debido a que activa el potencial de fusión de la membrana viral en la HA, esencialmente debido a que el corte en la HA<sub>0</sub> precursora libera el extremo hidrofóbico amino terminal (NH<sub>2</sub>) de la subunidad HA<sub>2</sub>, el cual durante la fusión es insertado en la membrana de la

célula infectada y de esta forma la molécula puede modificarse estructuralmente debido al pH ácido presente dentro de los endosomas.<sup>18</sup>

Aunque la patogenicidad es una propiedad del virus que está determinada por varios genes además de factores externos, se ha demostrado que los virus de Influenza Aviar considerados de baja patogenicidad poseen solamente un aminoácido básico, como Arginina (R) o Lisina (K), como péptido de fusión e incluso algún otro en la posición -3 o -4 en el sitio de corte, mientras que múltiples aminoácidos básicos en este sitio de la HA, que cabe destacar, es una región altamente conservada, es considerado un determinante universal de patogenicidad viral,<sup>3</sup> esto es debido a que aumenta la superficie del sitio de corte, haciéndolo más susceptible a proteasas intracelulares.<sup>10,18</sup>

La Neuraminidasa es una enzima con actividad hidrolasa, está asociada como un homotetrámero y cada subunidad está conformada por un dominio enzimáticamente y antigénicamente activo semejante a una “cabeza”, además de otro dominio hidrofóbico, semejante a un “tallo”, que se encuentra embebido en la membrana viral y que separa la “cabeza” de la membrana.<sup>2</sup> Se sabe poco de la función biológica del dominio hidrofóbico, con base a estudios previos se ha podido determinar que tiene gran influencia en la replicación del virus *in vivo*, en la adaptabilidad a diferentes hospedadores, en la eficiencia de la actividad enzimática e incluso en la virulencia.<sup>2,5</sup>

## 1.6 Mutaciones

Se ha estimado que la frecuencia de mutación de las proteínas HA y NA es alrededor del 1% anual y toma alrededor de 2 a 5 años alcanzar diferencias detectables en pruebas serológicas de laboratorio, como inhibición de la hemoaglutinación.<sup>19</sup> Es importante que se interprete de manera cautelosa la presencia de estas mutaciones como

determinantes definitivos de virulencia para humanos, aves u otras especies, ya que las cepas altamente patogénicas que han evolucionado a partir de las consideradas de baja patogenicidad no siempre contienen todos los marcadores de patogenicidad identificados, mientras que algunas cepas de baja patogenicidad sí los poseen, por lo que no hay en todos los casos una correlación entre los marcadores y el grado de patogenicidad.<sup>5,19</sup>

Se ha determinado que los aminoácidos presentes en determinadas posiciones en la HA, permiten el reconocimiento de los receptores de ácido siálico en diferentes hospedadores; la presencia de un aminoácido, por ejemplo, Glutamina (Gln) en determinada posición confiere preferencia a los receptores en aves, mientras que Leucina (Leu) en la misma posición confiere el reconocimiento a los receptores de ácido siálico en humanos.<sup>3,20</sup>

Es importante determinar qué aminoácidos están presentes en dichas posiciones ya que son los que originan la especificidad de unión hacia receptores de ácido siálico en las células del epitelio respiratorio en mamíferos, o bien en aves, y así poder evaluar la posible transmisión entre especies.

En cuanto la otra glicoproteína de superficie, la Neuraminidasa (NA), se han reportado mutaciones específicas para cada subtipo de NA que confieren resistencia a antivirales durante pases *in vitro* del virus o en aislamientos de casos clínicos. Ejemplos de estas mutaciones son: sustituciones en determinados aminoácidos (las cuales varían en frecuencia de acuerdo al subtipo) que confieren resistencia a los fármacos inhibidores de la NA como Oseltamivir, Peramivir, o Zanamivir.

## 1.7 Análisis *in silico* de secuencias

El término *in silico*, es un término moderno que se refiere a la experimentación realizada a través de una computadora; específicamente implica el uso de herramientas de bioinformática para unir el campo de la biología, las matemáticas y la informática para de esta forma desarrollar y mejorar métodos de análisis, almacenamiento, modelado e integración de la información.<sup>73</sup> En años recientes, el campo de la toxicología, farmacología y biología molecular *in silico* ha crecido rápidamente.

El uso de herramientas de bioinformática para el análisis de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos, involucra: el estudio de su posible función, estructura, origen filogenético, tiempo de divergencia evolutiva, identificación de mutaciones puntuales, caracterización de los marcos de lectura abiertos, traducción de nucleótidos, hallazgo de las modificaciones postraduccionales, predicción de su estructura tridimensional, así como de sus epítomos inmunogénicos, entre otras aplicaciones.<sup>74</sup>

El análisis *in silico* define el uso de esta información para la creación de modelos computacionales o simulaciones que pueden ser usados para hacer predicciones en el campo de la medicina, terapéutica, análisis de riesgo y epidemiología.<sup>73</sup>



## II. JUSTIFICACIÓN

En 2006 se aisló por primera vez en México un virus de influenza aviar en aves acuáticas migratorias que correspondió al subtipo H7N3, filogenéticamente relacionado con los virus aviares de Estados Unidos.<sup>21</sup> Posteriormente, en el año 2008, se logró el aislamiento de otro virus de influenza a través de patos centinelas.<sup>22</sup> Para el año 2009, se detectó por RT-PCR 4 virus de influenza aviar en aves acuáticas migratorias en el Estado de Sonora, que correspondieron a 3 diferentes subtipos de Hemoaglutininas: 2 virus H5, 1 virus H6 y 1 virus H9; en los que se encontró que los subtipos H5 y H6 están filogenéticamente relacionados con el linaje de América del Norte, mientras que el virus del subtipo H9 lo está con el linaje de Europa y Asia, lo cual demuestra la introducción de diferentes grupos genéticos virales a México muy probablemente a través de las rutas migratorias de la costa del Pacífico.<sup>23</sup>

A finales de la temporada migratoria de patos silvestres de 2011, en el Estado de México, se aisló un virus de influenza tipo A, a partir de agua<sup>24</sup>, que fue confirmado por la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) como perteneciente al subtipo H4N2, sin embargo, se desconoce si también está relacionado filogenéticamente con los virus de América del Norte.

Es por ello que en este trabajo se recurre a herramientas de bioinformática para determinar las relaciones filogenéticas del virus identificado como A/ambiente/México/2011 (H4N2), además de marcadores moleculares de virulencia y resistencia a fármacos antivirales.

### **III. HIPÓTESIS**

Con base a estudios filogenéticos realizados con anterioridad de virus de Influenza Aviar en el continente, el virus A/ambiente/México/2011(H4N2) está relacionado filogenéticamente con los virus aislados a partir de aves silvestres de América del Norte y, dado el subtipo, presenta características de un virus de Influenza de baja patogenicidad, a través del análisis *in silico* de la hemoaglutinina y neuraminidasa.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Determinar las relaciones filogenéticas y la presencia de marcadores moleculares de virulencia y resistencia a los fármacos antivirales del virus de Influenza A/ambiente/México/2011 (H4N2), a través del análisis de la Hemoaglutinina y Neuraminidasa, utilizando herramientas de bioinformática.



## Objetivos Particulares

- Editar las secuencias de nucleótidos de los segmentos 4 y 6 del virus A/ambiente/México/2011(H4N2).
- Comparar las secuencias nucleotídicas de dichos segmentos genómicos con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank.
- Realizar un análisis filogenético del virus A/ambiente/México/2011(H4N2) con las secuencias nucleotídicas de los segmentos 4 y 6, que corresponden a la HA y la NA.
- Traducir las secuencias de nucleótidos para analizar los marcadores de virulencia y resistencia a fármacos antivirales en la HA y NA, respectivamente, mediante el uso de herramientas de bioinformática.
- Obtener los modelos tridimensionales de la HA y NA para identificar en ellos los sitios de glicosilación, el sitio de corte, el sitio de unión a receptores en el primero y la región del “tallo” en el segundo.



## V MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Virus

Como parte del proyecto de maestría “Condiciones hidrológicas *in situ* de un bordo con aves acuáticas migratorias durante el aislamiento del virus de Influenza tipo A”<sup>24</sup> del biólogo Alejandro Obregón Ascencio, el 28 de febrero de 2011, se colectó una muestra de agua superficial del humedal llamado Bordo las Maravillas, perteneciente a la cuenca Lerma-Chapala-Santiago, ubicado al Noroeste del Estado de México. La muestra fue identificada como positiva a la prueba de hemoaglutinación en el Laboratorio de Ecomedicina Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Posteriormente, la muestra positiva fue enviada al laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), donde fue identificado como virus de Influenza A/ambiente/México/2011(H4N2).

#### 5.1.1 Obtención de las secuencias nucleotídicas de la Hemoaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA)


La secuenciación de nucleótidos de los segmentos genómicos 4 y 6 que codifican para dos glicoproteínas de superficie del virus: la hemoaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), respectivamente, fue realizada en el Laboratorio de Ecomedicina Aviar-UNAM. Estas secuencias se utilizaron en este estudio para realizar un análisis *in silico*.

### 5.2 Secuencias similares

Se realizaron alineamientos pareados múltiples utilizando el programa disponible en

línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>),<sup>25</sup> para comparar las secuencias nucleotídicas

---

Análisis *in silico* de la Hemoaglutinina y Neuraminidasa del virus de Influenza subtipo H4N2 | 

Erika Ornelas Eusebio



de los segmentos 4 y 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con aquellas disponibles en el banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

### 5.3 Secuencias utilizadas para el análisis filogenético

Para realizar el análisis filogenético se seleccionaron 36 secuencias del segmento 4 y 34 secuencias del segmento 6 del virus de Influenza Aviar subtipo H4N2 a partir del banco de genes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).<sup>26</sup> Las secuencias corresponden a aislamientos virales realizados a partir de aves en América del Norte, Europa, Asia u Oceanía y se incluyeron todas aquellas con el 100% del marco abierto de lectura y sin espacios dentro de la secuencia. Todas son del subtipo H4N2 con excepción de la secuencia de subtipo mixto que se incluyó en el análisis del segmento 6. En el anexo 1 y 2 están enlistados los virus cuyas secuencias nucleotídicas fueron utilizadas, con número de acceso, longitud, hospedero, país, ciudad y fecha de aislamiento (desde 1976 hasta 2009).

### 5.4 Análisis filogenético

Se realizaron alineamientos de las secuencias nucleotídicas obtenidas del banco de genes para los dos segmentos analizados y se incluyeron en ellos las secuencias genómicas de los segmentos 4 y 6 que corresponden al virus A/ambiente/México/2011(H4N2), utilizando el método de alineamiento progresivo de Clustal W. A continuación, se calcularon el número de cambios y, con el modelo Kimura dos parámetros, las distancias genéticas que hay entre los dos grupos de secuencias que corresponden al análisis de los dos segmentos genómicos, con el programa MEGA versión 5.05.<sup>27</sup>

En base a las distancias genéticas obtenidas, se construyeron los 2 dendrogramas: 1 para el segmento 4 y otro para el segmento 6 con el algoritmo Neighbor-Joining empleando el programa MEGA versión 5.05.<sup>27</sup> Las estimaciones de la significancia estadística de la filogenia se calcularon mediante el método de 1000 réplicas.

A partir de cada árbol filogenético se definieron grupos de acuerdo a los nodos observados en la topología, los grupos corresponden a las regiones geográficas y años de aislamiento de los virus. Se calcularon las distancias genéticas entre grupos y dentro de los grupos utilizando el programa MEGA versión 5.05.<sup>27</sup>

## 5.5 Traducción de las secuencias

Se tradujeron las secuencias de nucleótidos a aminoácidos de los segmentos 4 y 6 del virus A/ambiente/México/2011(H4N2) y de aquellas utilizadas para hacer el análisis filogenético, utilizando el programa en línea ExPASy que pertenece al Instituto Suizo de Bioinformática.<sup>28</sup>

## 5.6 Identificación del sitio de corte

Para la identificación del sitio de corte dado por una Arginina o Lisina, que es la región blanco del corte proteolítico, se empleó el Servidor de Predicción ProP 1.0 del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBS) de la Universidad Técnica de Dinamarca.<sup>29,30</sup>

## 5.7 Identificación de los sitios de glicosilación y del sitio de unión a receptores

Se utilizó el servidor NetNGlyc 1.0 del CBS<sup>31</sup>, para identificar los sitios de glicosilación asociados a Asparagina en la Hemoaglutinina, asumiendo que la cadena de

oligosacáridos es adicionada a la Asparagina (N) cuando ocurre N-X-[T/S], en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Prolina (P).<sup>32</sup>

Se identificó el sitio de unión a receptores de acuerdo al descrito por Bateman *et al.* y Glaser *et al.*,<sup>33,34</sup> así como la presencia de alguna mutación en esta región que modifique el reconocimiento de los receptores en diferentes hospedadores, mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los virus utilizados para el análisis filogenético con el programa MEGA versión 5.05.<sup>27</sup>

## 5.8 Reconocimiento del dominio hidrofóbico en la NA

Para identificar deleciones de al menos 10 aminoácidos en el dominio hidrofóbico conocido como región tallo de la Neuraminidasa, la cual comienza en el residuo 36 y termina con una Cisteína (Cys= C) altamente conservada en la posición 92,<sup>35</sup> se alineó y comparó la secuencia de aminoácidos de la NA del virus A/ambiente/México/2011(H4N2) con la del virus A/chicken/Queretaro/14588-19(H5N2), con número de acceso ABI85130 en el banco de genes del NCBI; este virus es considerado altamente virulento para las aves comerciales y se demostró en un estudio previo que presenta una deleción de 20 aminoácidos en dicha región de la NA.<sup>36</sup>

## 5.9 Identificación de mutaciones asociadas a resistencia contra fármacos inhibidores de Neuraminidasa

Se determinó en la NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos con el programa MEGA versión 5.05, la presencia de mutaciones previamente reportadas que confieran resistencia a antivirales.

Con base en estudios anteriores, se han descrito 19 mutaciones que confieren resistencia a fármacos conocidos como inhibidores de Neuraminidasa: 9 mutaciones hacia Oseltamivir (V116A, I117V, E119V, D198N, I222V, H274Y, R292K, N294S y I314V) y 10 hacia Zanamivir (V116A, R118K, E119G/A/D, Q136K, D151E/G/N, R152K, R224K, E276D, R292K y R371K).<sup>37-41</sup>

### 5.10 Modelos tridimensionales de las proteínas HA y NA

La predicción de las estructuras tridimensionales de las proteínas Hemoaglutinina y Neuraminidasa del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), se realizó mediante la herramienta de modelado automático del programa en línea Swiss-Model del Instituto Suizo de Bioinformática,<sup>42</sup> a partir de modelos depositados en el banco de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés).<sup>43</sup> Adicionalmente, se predijo la estructura tridimensional de la HA del virus A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7)<sup>44</sup> de alta patogenicidad para compararla con la del virus A/ambiente/México/2011(H4N2).

Se utilizó el programa PyMOL<sup>45</sup> para marcar en los modelos: el sitio de corte, el péptido conector, los sitios de glicosilación y los sitios de unión a receptores en el modelo de la HA, así como el dominio hidrofóbico conocido como tallo en el modelo de la NA.

## VI RESULTADOS

### 6.1 Secuencias similares

Al realizar alineamientos múltiples pareados con el programa BLAST del segmento genómico 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), se encontró un 97% de identidad con el virus A/pekin duck/California/P30/2006 (H4N2), con número de acceso CY053821 en el banco de genes.

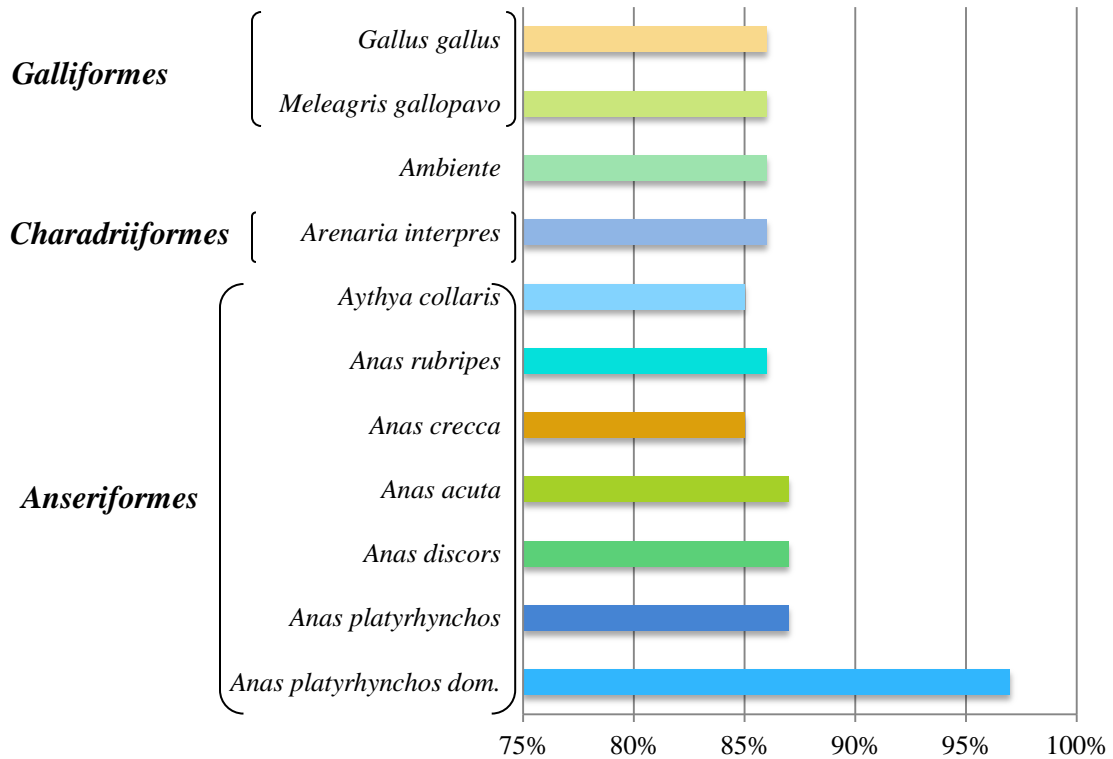
El resto de las 99 de 100 secuencias desplegadas corresponden al subtipo H4, mostrando una similitud con el segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) que está entre 85 y 87%. Todas ellas pertenecen a aislamientos realizados en América del Norte entre los años de 1975 y 2007, a partir de aves acuáticas silvestres, pavos (*Meleagris gallopavo*) y pollos domésticos (*Gallus gallus*) y de muestras ambientales (Cuadro 1).

La mayoría de las secuencias, así como las que presentan un porcentaje mayor de similitud, obtenidas al hacer la comparación de la secuencia del segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con aquellas secuencias del banco de genes, mediante el programa BLAST, corresponden a virus aislados a partir de aves del orden *Anseriformes*, como se muestra en la figura 1, dentro del cual destaca el pato de collar (*Anas platyrhynchos*), y en segundo lugar la cerceta alas azules (*Anas discors*).

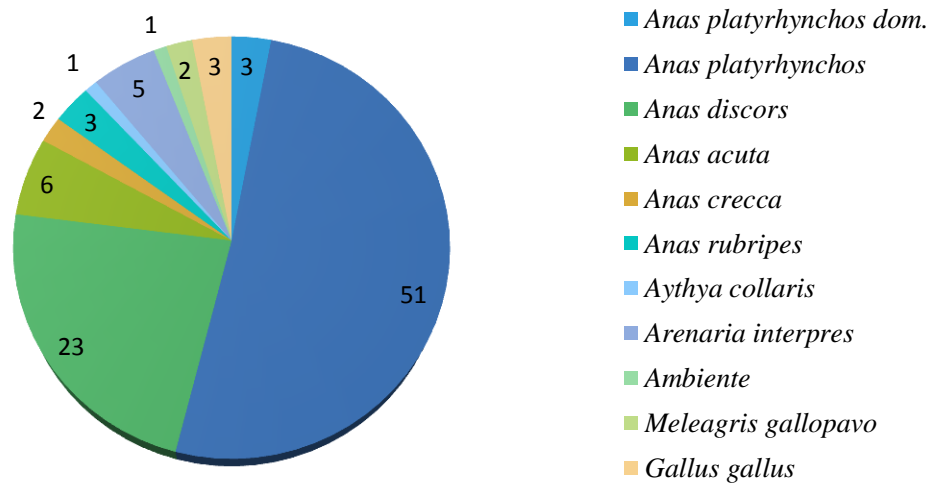
**Cuadro 1. Porcentaje de identidad nucleótido-nucleótido obtenido al hacer alineamientos pareados utilizando el programa BLAST, con la secuencia del segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) y las secuencias disponibles en el banco de genes.** En las columnas se muestra: el linaje al que pertenecen los virus, el subtipo del virus, la especie de la cual provino el aislamiento, el año de aislamiento y entre paréntesis el número de virus cuyas secuencias son similares por especie sumando un total de 100.

| Linaje                                      | Subtipo                   | Especie                              | Años de aislamiento                                     | % de Identidad |
|---|---------------------------|--------------------------------------|---|----------------|
| América del Norte (Estados Unidos y Canadá) | H4N2                      | <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> | 2006 (1)  | 97%            |
|   |                           | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 1978, 1979, 1984-1989, 2002 (8)                         | 86% - 87%      |
|   |                           | <i>Anas discors</i>                  | 1979 (2)  | 86% - 87%      |
|   |                           | <i>Anas acuta</i>                    | 1979 (1)  | 86%            |
|   |                           | <i>Anas crecca</i>                   | 1986 (1)  | 86%            |
|   |                           | <i>Meleagris gallopavo</i>           | 1980 (2)  | 86%            |
|   | H4N6                      | <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> | 1976 (1)  | 87%            |
|   |                           | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 1977, 1986-1991, 1995, 1998, 1999, 2002, 2006-2008 (31) | 85% - 87%      |
|   |                           | <i>Anas discors</i>                  | 1985-1986, 1990, 1994, 2003, 2006-2007 (15)             | 85% - 87%      |
|   |                           | <i>Anas rubripes</i>                 | 2006 (1)  | 86%            |
|   |                           | <i>Anas acuta</i>                    | 1985, 1996, 2001 (3)                                    | 85%- 86%       |
|   |                           | <i>Arenaria interpres</i>            | 1985, 1988, 2008 (5)                                    | 86%            |
|   |                           | <i>Aythya collaris</i>               | 2007 (1)  | 85%            |
|   |                           | Ambiente                             | 2006 (1)  | 86%            |
|   | Mixto                     | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 1992, 2002, 2006 (5)                                    | 85% - 86%      |
|   |                           | <i>Anas discors</i>                  | 2007 (4)  | 85% - 86%      |
|   |                           | <i>Anas crecca</i>                   | 2007 (1)  | 85%            |
|   |                           | <i>Anas rubripes</i>                 | 2002 (1)  | 86%            |
|   | H4N8                      | <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> | 1980 (1)  | 86%            |
|   |                           | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 1977, 1982, 1986, 1999 (4)                              | 86%            |
|   |                           | <i>Anas acuta</i>                    | 1977 (1)  | 87%            |
|   |                           | <i>Anas rubripes</i>                 | 2002 (1)  | 86%            |
|   |                           | <i>Gallus gallus</i>                 | 1975, 2005 (3)  | 86%            |
| H4N3  | <i>Anas discors</i>       | 1990 (1)                             | 86%   |                |
|   | <i>Anas acuta</i>         | 1982 (1)                             | 86%   |                |
| H4N5  | <i>Anas discors</i>       | 1990 (1)                             | 87%   |                |
| H4N1  | <i>Anas platyrhynchos</i> | 1977 (1)                             | 87%   |                |
| H4N4  | <i>Anas platyrhynchos</i> | 1983 (1)                             | 86%   |                |
| H4N9  | <i>Anas platyrhynchos</i> | 1986 (1)                             | 86%   |                |

**a) Porcentaje de Similitud por especie**



**b) Número de secuencias similares por especie**



**Figura 2. Porcentaje de similitud (a) y número de secuencias similares (b) por especie al comparar la secuencia del segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con aquellas disponibles en el banco de genes, utilizando el programa BLAST. La secuencia con el mayor porcentaje de similitud proviene de un virus aislado a partir de un pato doméstico (*Anas platyrhynchos domesticus*), y el mayor número de secuencias similares a la del**

segmento 4 del virus analizado lo tiene el pato de collar (*Anas platyrhynchos*), con 51 de las 100 secuencias reportadas en el análisis con BLAST.

De la misma forma que con la secuencia del segmento 4, al analizar la secuencia del segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con el programa BLAST, se encontró que 94 secuencias provienen de aislamientos realizados en América del Norte y 6 provienen de Europa, Asia u Oceanía. El mayor porcentaje de similitud lo tiene el virus A/mallard/Mississippi/407/2010 de subtipo mixto (número de acceso CY097754), con 99% de identidad; y en segundo lugar, con 98% de similitud, está el virus A/pekin duck/California/P30/2006 (H4N2), con número de acceso CY053823 (Cuadro 2).

Respecto a las 92 de las 94 secuencias similares restantes provenientes de América del Norte, 71 corresponden a virus aislados a partir de aves del orden *Anseriformes* (dentro del cual destaca en frecuencia y porcentaje de similitud el pato de collar), 16 a aves del orden *Galliformes*, 2 a aves del orden *Charadriiformes*, 1 a un ave del orden *Gruiformes*, 1 a un ave sin identificar y por último, 1 a una muestra ambiental, como se muestra en la figura 2.

Las 6 secuencias provenientes de virus aislados a partir de aves en Europa, Asia u Oceanía, tienen un porcentaje de similitud que va del 90% al 91% respecto a la secuencia del segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2). Nuevamente el pato de collar (con 4 de estas 6 secuencias ) alcanza el mayor porcentaje de similitud; otra secuencia pertenece a un virus aislado de un fumarel cariblanco (*Chlidonias hybridus*) del orden *Charadriiformes*, y la última secuencia proviene de un virus aislado de un cerdo doméstico en Corea del Sur con una similitud del 91%.

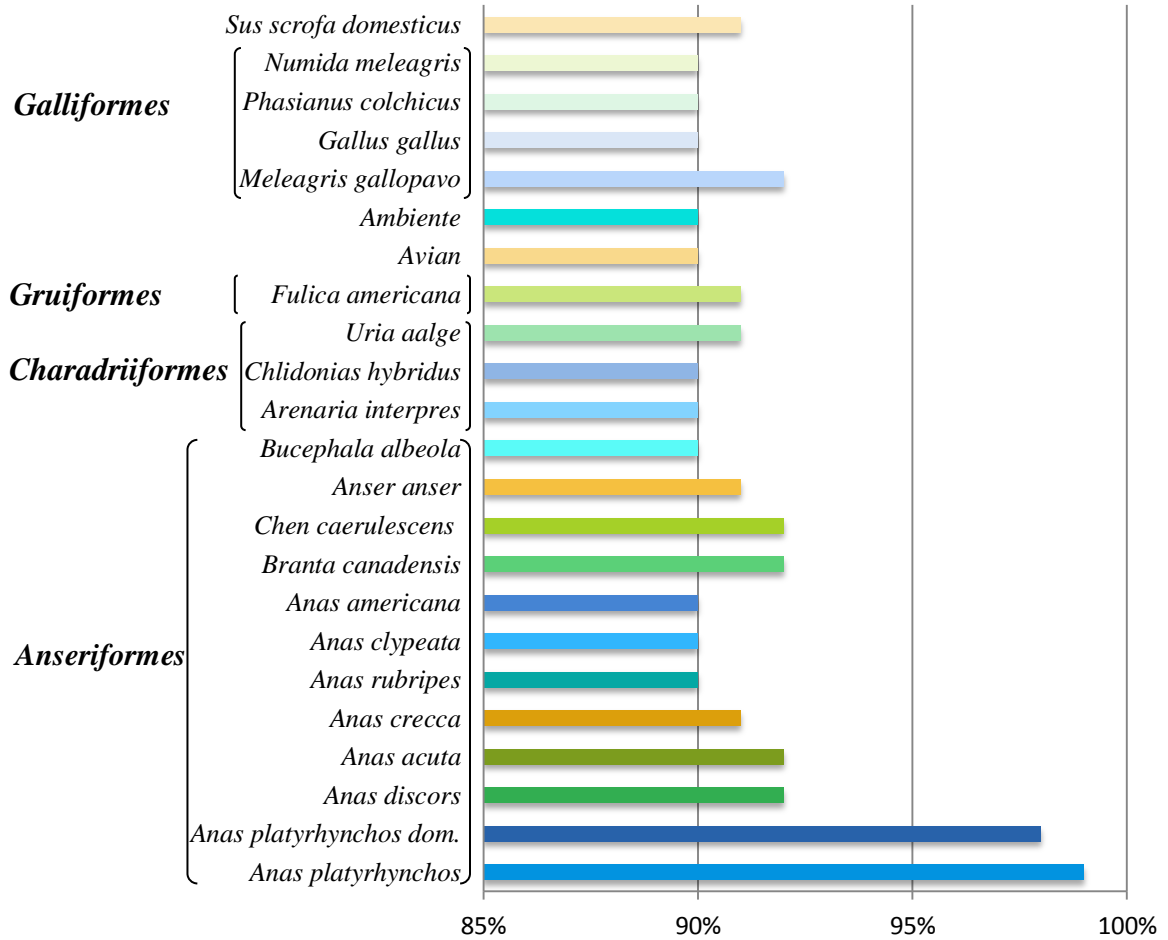


**Cuadro 2. Porcentaje de identidad nucleótido-nucleótido obtenido al hacer alineamientos pareados utilizando el programa BLAST, con la secuencia del segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) y las secuencias disponibles en el banco de genes.** En las columnas se muestra: el linaje al que pertenecen los virus, el subtipo del virus, la especie de la cual provino el aislamiento, el año de aislamiento y entre paréntesis se el número de virus cuyas secuencias son similares por especie sumando un total de 100.

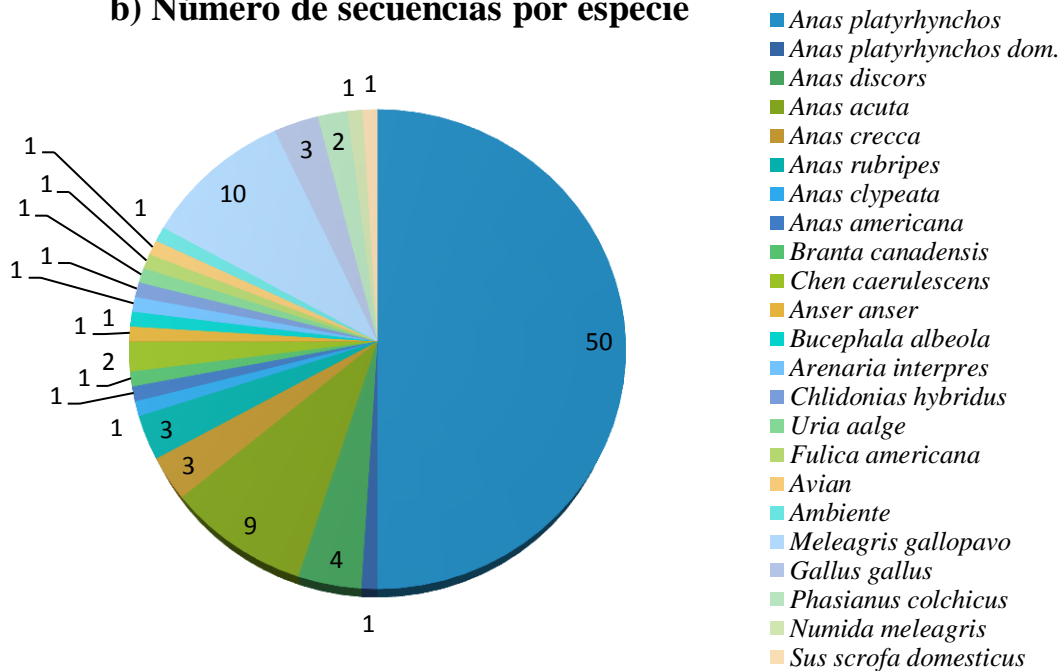
| Linaje                                      | Subtipo | Especie                              | Años de aislamiento                    | % de Identidad |
|---|---------|--------------------------------------|--|----------------|
| América del Norte (Estados Unidos y Canadá) | Mixto   | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 2010 (1)                               | 99%            |
|   |         |                                      | 1986, 1987 (2)                         | 90% - 91%      |
|   | H4N2    | <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> | 2006 (1)                               | 98%            |
|   |         | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 1978, 1979, 1982, 1984, 1987, 1989 (8) | 90% - 92%      |
|   |         | <i>Anas acuta</i>                    | 1979 (1)                               | 91%            |
|   |         | <i>Anas discors</i>                  | 1979 (2)                               | 91%            |
|   |         | <i>Meleagris gallopavo</i>           | 1980 (1)                               | 91%            |
|   |         | <i>Anas crecca</i>                   | 1986 (1)                               | 91%            |
|   | H6N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 1978, 1985, 1986, 1987, 1999 (11)      | 90% - 92%      |
|   |         | <i>Anas acuta</i>                    | 1978, 1979, 1985, 1987, 1989 (6)       | 90%, 92%       |
|   |         | <i>Anas discors</i>                  | 1978, 1985 (2)                         | 90%, 92%       |
|   |         | <i>Fulica americana</i>              | 1987 (1)                               | 91%            |
|   |         | <i>Anas clypeata</i>                 | 1985 (1)                               | 90%            |
|   |         | <i>Anas crecca</i>                   | 1986, 1998 (2)                         | 90%            |
|   |         | <i>Anas rubripes</i>                 | 1986, 1987 (2)                         | 90%            |
|   |         | <i>Meleagris gallopavo</i>           | 1965 (3)                               | 90%            |
|   | H5N2    | <i>Branta canadensis</i>             | 1975 (1)                               | 92%            |
|   |         | <i>Chen caerulescens</i>             | 1975, 2006 (2)                         | 90%, 92%       |
|   |         | <i>Meleagris gallopavo</i>           | 1972, 1981, 1982, 1987 (4)             | 91% - 92%      |
|   |         | <i>Anas platyrhynchos</i>            | 1976, 1980, 1982, 1982, 1984, 2006 (9) | 90% - 92%      |
|   |         | <i>Anas rubripes</i>                 | 1988 (1)                               | 90%            |
|   |         | <i>Anas americana</i>                | 1988 (1)                               | 90%            |
| <i>Phasianus colchicus</i>                  |         | 1993, 1998 (2)                       | 90%                                    |                |
| Ambiente                                    |         | 2007 (1)                             | 90%                                    |                |

|                                 |                   |                              |  |           |
|---------------------------------|-------------------|------------------------------|--|-----------|
| Euroasia (Corea, Japón, Egipto) | H3N2              | <i>Anas acuta</i>            | 1976, 1979 (2)                         | 91% - 92% |
|                                 |                   | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1978, 1986, 1987, 1988, 1999, 2009 (8) | 90% - 91% |
|                                 | H9N2              | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1988, 1991 (4)                         | 90% - 91% |
|                                 |                   | <i>Meleagris gallopavo</i>   | 1981, 1989 (2)                         | 90% - 91% |
|                                 |                   | <i>Anser anser</i>           | 1980 (1)                               | 91%       |
|                                 | H2N2              | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1978 (1)                               | 92%       |
|                                 |                   | <i>Gallus gallus</i>         | 1990, 1991 (3)                         | 90%       |
|                                 |                   | <i>Numida meleagris</i>      | 1990 (1)                               | 90%       |
|                                 |                   | Ave                          | 1990 (1)                               | 90%       |
|                                 | H11N2             | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1991 (1)                               | 90%       |
|                                 |                   | <i>Bucephala albeola</i>     | 1986 (1)                               | 90%       |
|                                 |                   | <i>Arenaria interpres</i>    | 1987 (1)                               | 90%       |
|                                 | H1N2              | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1982 (1)                               | 91%       |
| H10N2                           | <i>Uria aalge</i> | 2006 (1)                     | 91%                                    |           |
| Euroasia (Corea, Japón, Egipto) | H7N2              | <i>Sus scrofa domesticus</i> | 2001 (1)                               | 91%       |
|                                 |                   | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1978 (2)                               | 91%       |
|                                 | H9N2              | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1979 (1)                               | 90%       |
|                                 | H3N2              | <i>Anas platyrhynchos</i>    | 1977 (1)                               | 91%       |
|                                 | H6N2              | <i>Chlidonias hybridus</i>   | 2004 (1)                               | 90%       |

**a) Porcentaje de Similitud por especie**



**b) Número de secuencias por especie**



**Figura 3. Porcentaje de similitud (a) y número de secuencias similares (b) por especie al comparar la secuencia del segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con aquellas disponibles en el banco de genes, utilizando el programa BLAST.** La secuencia con el mayor porcentaje de similitud, así como el mayor número de secuencias similares a la del segmento 6 del virus analizado, provienen de virus aislados a partir de pato de collar (*Anas platyrhynchos*), con 50 de las 100 secuencias reportadas en el análisis con BLAST.

## 6.2 Cálculo del número de diferencias y de las distancias genéticas entre las secuencias

Se realizó un alineamiento global mediante Clustal W de las 37 secuencias del segmento 4 y de las 35 secuencias del segmento 6, incluidas en el análisis filogenético. Se obtuvo el número de cambios y las distancias genéticas entre cada secuencia, de acuerdo al modelo Kimura dos parámetros, dichos cuadros se encuentran en los anexos 4 y 5.

Al comparar el número de cambios de la secuencia de nucleótidos del segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con las demás secuencias provenientes de América del Norte, se observa que el menor número de cambios es de 38 nucleótidos entre la secuencia bajo análisis y aquella del virus A/pekin duck/California/P30/2006 (H4N2). Mientras que el mayor número de cambios es de 248 nucleótidos entre la secuencia bajo análisis y aquellas de los virus A/American black duck/Wisconsin/2542/2009 (H4N2) y A/mallard/Wisconsin/2530/2009 (H4N2). La distancia genética entre las secuencias de América del Norte y el segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) está entre 0.02 y 0.18, con un promedio de 0.16, de acuerdo al modelo Kimura 2 parámetros.

Lo anterior ocurre de forma similar en el segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) al compararlo con las secuencias provenientes de

América del Norte, se encontró que el menor número de cambios nucleotídicos es de 20 en relación a la secuencia perteneciente al virus A/mallard/Mississippi/407/2012 (mixed) y 28 cambios respecto a la secuencia perteneciente al virus A/pekin duck/California/P30/2006 (H4N2). Mientras que el mayor número de cambios es de 179 nucleótidos al compararla con el virus A/mallard/California/5192/2009 (H4N2). La distancia genética entre las secuencias de América del Norte y el segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) está entre 0.01 y 0.14, con un promedio de 0.10, de acuerdo al modelo Kimura 2 parámetros.

En contraste, para ambos segmentos, hay comparativamente mayor número de cambios entre el segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) y las secuencias del grupo de Europa, Asia y Oceanía, con un rango que va de 253 a 333 cambios nucleotídicos, originando así una distancia mínima de 0.18 y una máxima de 0.25, con un promedio de 0.23. Esto también ocurre para la secuencia del segmento 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), al compararla con aquellas del grupo euroasiático, el menor número de cambios es de 175 y el mayor de 206, dando lugar a una distancia mínima de 0.14 y una máxima de 0.17, con un promedio de 0.15.

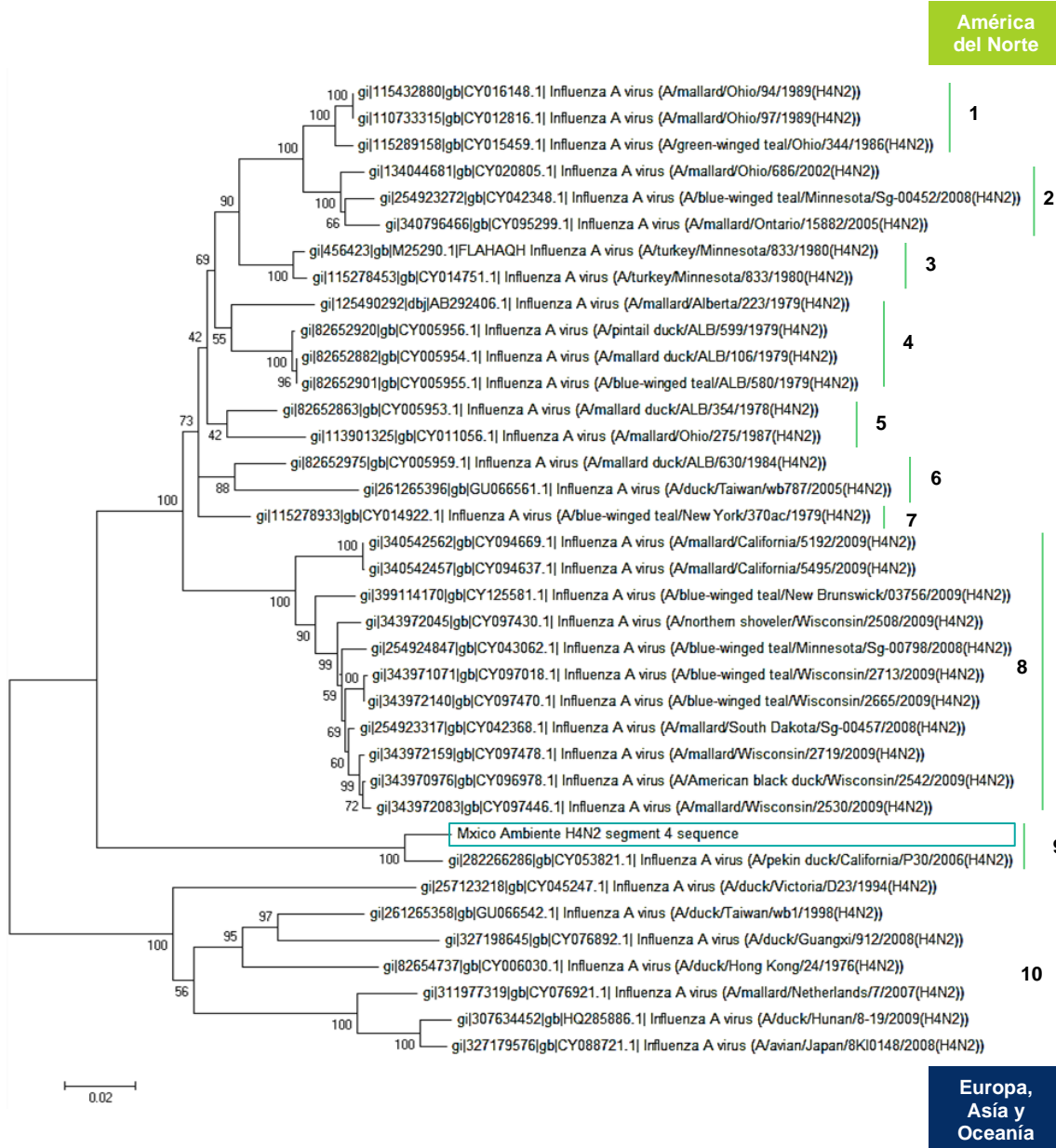


### 6.3 Construcción de los árboles filogenéticos

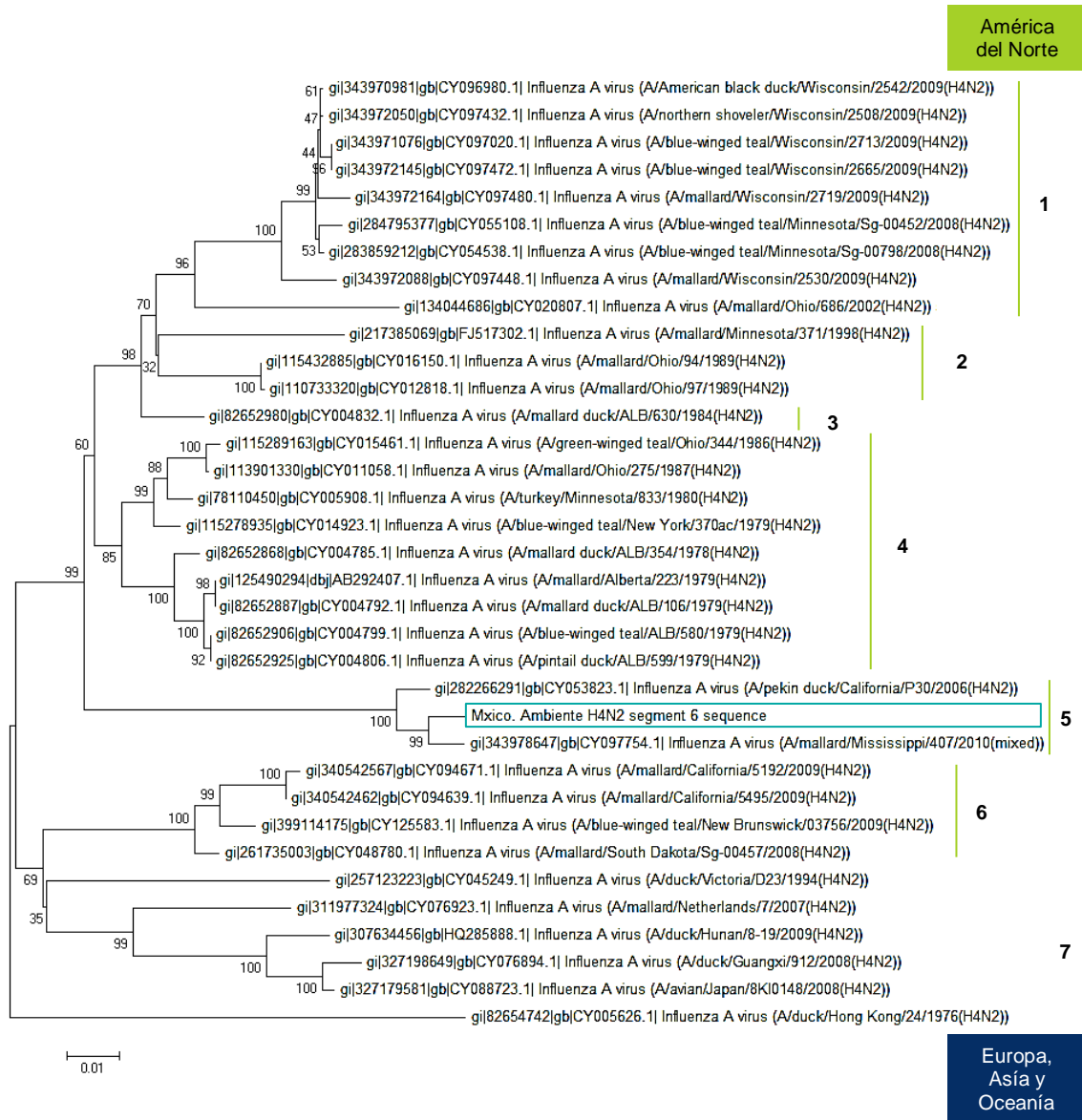
Se construyeron dos dendrogramas empleando el método Neighbor-Joining: uno incluyendo las 37 secuencias nucleotídicas alineadas del segmento 4 (figura 4) y otro con las 35 secuencias nucleotídicas del segmento 6 (figura 5).

En ambos dendrogramas se observa la agrupación de las secuencias de acuerdo a la región geográfica a la que pertenecen los virus aislados, dividiéndose en dos grandes grupos: el de América del Norte y el de Europa, Asia y Oceanía. Sin embargo, en el dendrograma del segmento 4 se observa una excepción con el virus A/duck/Taiwan/wb787/2005 (H4N2), el cual fue aislado en Asia y se agrupa dentro de las secuencias pertenecientes al grupo de América del Norte.

Dentro del grupo de América del Norte se distinguen 9 grupos para el dendrograma del segmento 4 y 6 para el del segmento 6, que corresponden a diferentes nodos observados en la topología. Se encontró una agrupación que muestra una correlación entre el año en que se llevó a cabo el aislamiento del virus y la distancia genética que hay entre las secuencias, como se muestra en las figuras 4 y 5.



**Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias del segmento 4.** Dendrograma inferido mediante el método de Neighbor-Joining con las 37 secuencias nucleotídicas incluidas en el análisis filogenético de virus del subtipo H4N2 aislados en América del Norte (en verde) y de Europa, Asia y Oceanía (en azul). A la derecha se observa el número del grupo asignado a ese nodo. El virus *A/ambiente/México/2011* (H4N2) se encuentra señalado en un recuadro verde. En cada nodo se encuentra el valor en porcentaje que indica las veces que se repite la topología de cada rama en 1000 réplicas. La barra de escala en la esquina inferior izquierda indica los cambios evolutivos de acuerdo al modelo de Kimura dos parámetros.



**Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias del segmento 6.** Dendrograma inferido mediante el método de Neighbor-Joining con las 35 secuencias nucleotídicas incluidas en el análisis filogenético de virus del subtipo H4N2 aislados en América del Norte (en verde) y de Europa, Asia y Oceanía (en azul). A la derecha se observa el número del grupo asignado a ese nodo. El virus *A/ambiente/México/2011* (H4N2) se encuentra señalado en un recuadro verde. En cada nodo se encuentra el valor en porcentaje que indica las veces que se repite la topología de cada rama en 1000 réplicas. La barra de escala en la esquina inferior izquierda indica los cambios evolutivos de acuerdo al modelo de Kimura dos parámetros.



Para ambos dendrogramas, la distancia genética promedio dentro de cada grupo es  $\leq 0.02$ , excepto en el grupo 5 y 6 del dendrograma del segmento 4 (figura 4) y el grupo 2 del dendrograma del segmento 6 (figura 5), cuyas secuencias tienen una separación temporal cercana a los 10 años para el caso del grupo 5 y 2, o bien, las secuencias provienen de regiones geográficas diferentes, para el caso del grupo 6; en ellos, la distancia promedio es mayor al resto, como se muestra en el cuadro 3 a) y 4 a).

Por otro lado, la distancia que hay entre cada grupo del dendrograma del segmento 4, es  $\geq 0.03$ , como se muestra en el cuadro 3 b); mientras que la distancia que hay entre cada grupo del dendrograma del segmento 6 es  $\geq 0.04$ , como se muestra en el cuadro 4 b).

La mayor distancia genética observada se encuentra entre los grupos de secuencias de América del Norte y el grupo de secuencias de Europa, Asia y Oceanía. En el dendrograma del segmento 4 la mayor distancia es 0.24, observada entre el grupo 9, donde se ubica la secuencia del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), y el grupo 10, que corresponde al grupo de secuencias de origen euroasiático. Para el dendrograma del segmento 6, la mayor distancia es 0.15, la cual se observa entre el grupo 5, donde también se ubica el virus bajo estudio y el grupo 7, que también corresponde al grupo euroasiático.

**Cuadro 3. Estimación de la divergencia evolutiva de las secuencias dentro de los grupos (a) y entre ellos (b) designados de acuerdo a la topología del dendrograma del segmento 4.** El análisis se realizó con el modelo Kimura dos parámetros. Se señalan en verde los grupos formados en el dendrograma con las secuencias provenientes de América del Norte y en azul con el grupo formado por las secuencias provenientes de Europa, Asia u Oceanía. Con asterisco se señalan los grupos con una distancia promedio dentro de ellos mayor a la del resto.

| a)       |      |
|----------|------|
| Grupo 10 | 0.11 |
| Grupo 6* | 0.05 |
| Grupo 5* | 0.04 |
| Grupo 9  | 0.02 |
| Grupo 8  | 0.02 |
| Grupo 4  | 0.02 |
| Grupo 2  | 0.02 |
| Grupo 3  | 0.01 |
| Grupo 1  | 0.01 |
| Grupo 7  | 0    |

| b)     | Gpo 9 | Gpo 4 | Gpo 5 | Gpo 6 | Gpo 1 | Gpo 3 | Gpo 7 | Gpo 2 | Gpo 8 | Gpo 10 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Gpo 9  | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |        |
| Gpo 4  | 0.16  |       |       |       |       |       |       |       |       |        |
| Gpo 5  | 0.16  | 0.05  |       |       |       |       |       |       |       |        |
| Gpo 6  | 0.17  | 0.06  | 0.05  |       |       |       |       |       |       |        |
| Gpo 1  | 0.16  | 0.06  | 0.07  | 0.09  |       |       |       |       |       |        |
| Gpo 3  | 0.16  | 0.04  | 0.05  | 0.06  | 0.05  |       |       |       |       |        |
| Gpo 7  | 0.16  | 0.04  | 0.03  | 0.05  | 0.07  | 0.04  |       |       |       |        |
| Gpo 2  | 0.17  | 0.07  | 0.08  | 0.09  | 0.03  | 0.06  | 0.07  |       |       |        |
| Gpo 8  | 0.18  | 0.08  | 0.08  | 0.08  | 0.10  | 0.08  | 0.06  | 0.11  |       |        |
| Gpo 10 | 0.24  | 0.20  | 0.21  | 0.21  | 0.20  | 0.20  | 0.20  | 0.20  | 0.22  | -      |

**Cuadro 4. Estimación de la divergencia evolutiva de las secuencias dentro de los grupos (a) y entre ellos (b) designados de acuerdo a la topología del dendrograma del segmento 6.** El análisis se realizó con el modelo Kimura dos parámetros. Se señalan en verde los grupos formados en el dendrograma con las secuencias provenientes de América del Norte y en azul con el grupo formado por las secuencias provenientes de Europa, Asia u Oceanía. Con asterisco se señalan los grupos con una distancia promedio dentro de ellos mayor a la del resto.

| a)       |      |
|----------|------|
| Grupo 7  | 0.10 |
| Grupo 2* | 0.04 |
| Grupo 4  | 0.02 |
| Grupo 1  | 0.02 |
| Grupo 6  | 0.02 |
| Grupo 5  | 0.02 |
| Grupo 3  | 0    |

| b)    | Gpo 5 | Gpo 4 | Gpo 3 | Gpo 2 | Gpo 1 | Gpo 6 | Gpo 7 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Gpo 5 | -     |       |       |       |       |       |       |
| Gpo 4 | 0.09  |       |       |       |       |       |       |
| Gpo 3 | 0.10  | 0.04  |       |       |       |       |       |
| Gpo 2 | 0.11  | 0.06  | 0.04  |       |       |       |       |
| Gpo 1 | 0.12  | 0.07  | 0.05  | 0.06  |       |       |       |
| Gpo 6 | 0.14  | 0.08  | 0.09  | 0.11  | 0.11  |       |       |
| Gpo 7 | 0.15  | 0.10  | 0.11  | 0.12  | 0.13  | 0.10  | -     |

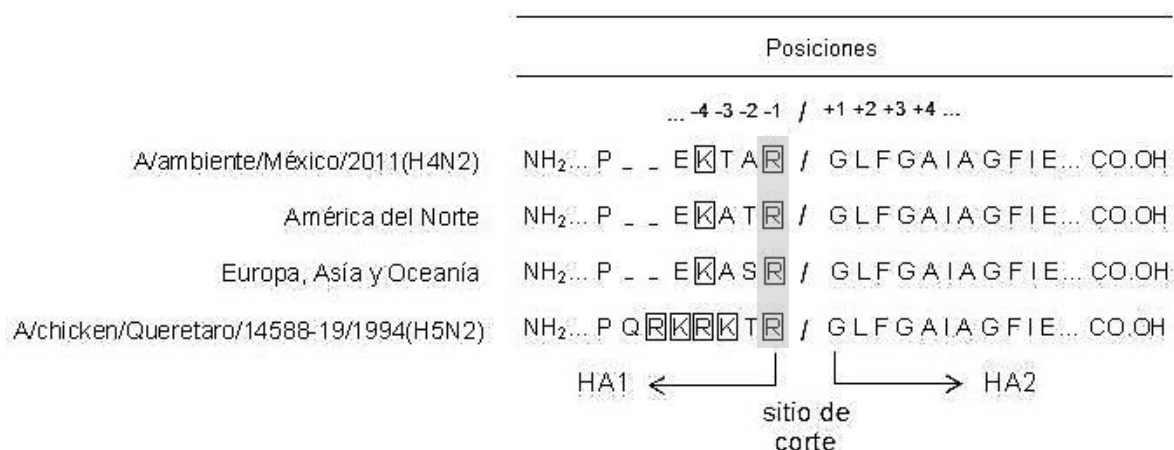
## 6.4 El sitio de corte en la Hemoaglutinina

En base a la secuencia de 1709 nt proporcionada por el Laboratorio de Ecomedicina Aviar, la cual corresponde al 98.33% del segmento 4 del genoma del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), de acuerdo a Donis *et al.*, se tradujo una secuencia de 562 aminoácidos, que corresponde al 99.6% del total de la secuencia reportada para la HA del subtipo H4.<sup>46</sup>

Con el Servidor de Predicción ProP 1.0 del CBS, se identificó el sitio de corte en el extremo carboxilo de la Arginina (Arg= R) en la posición 343, como se muestra en la figura 6. Una vez ocurrido el evento proteolítico, el resultado son dos polipéptidos maduros: HA<sub>1</sub> y HA<sub>2</sub>, que se encuentran unidos por un solo enlace disulfuro, mientras que el péptido conector de 17 aminoácidos, ubicado alrededor del sitio de corte, se reposiciona en una cavidad formada en la subunidad HA<sub>1</sub>.

La secuencia deducida de 562 aminoácidos del segmento 4 del genoma del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), se alineó y comparó con aquellas de los virus de referencia pertenecientes a los grupos de secuencias de origen norteamericano y euroasiático, utilizadas para el análisis filogenético. Además, se incluyó en el alineamiento la secuencia de un virus de alta patogenicidad subtipo H5N2 (A/chicken/Queretaro/14588-19/1994), para realizar la comparación entre el sitio de corte de este virus y los de baja patogenicidad (figura 6).

Este alineamiento muestra que la secuencia de aminoácidos presente en el péptido conector y sitio de corte de la Hemoaglutinina del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) sólo difiere del resto de las pertenecientes a América del Norte en la posición de dos aminoácidos ubicados en el péptido conector: la Alanina (A) y la Treonina (T). Mientras que, en la secuencia consenso de dicha región para el linaje euroasiático, se observa la sustitución de una Serina (S) por una Treonina (T) en la posición -2.



**Figura 6. Comparación de los aminoácidos que están en el péptido conector y sitio de corte de la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), las secuencias consenso del grupo de virus de origen norteamericano y euroasiático y la secuencia de un virus de alta patogenicidad A/chicken/Queretaro/14588-19/1994 (H5N2).** Los aminoácidos básicos están señalados dentro de los recuadros. La Arginina donde ocurre el corte proteolítico está sombreada en gris.

La secuencia de aminoácidos encontrada en el sitio de corte del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), corresponde a la descrita para virus de baja patogenicidad, que se caracterizan por tener un solo aminoácido básico en este sitio e incluso algún otro en la posición -3 ó -4 del péptido conector.<sup>10</sup> En comparación, los virus de alta patogenicidad presentan inserciones de aminoácidos básicos en el sitio de corte,

como el virus A/chicken/Queretaro/14588-19/1994 (H5N2) que tiene una inserción de 3 aminoácidos básicos, esta es una característica de virulencia (ver figura 5).<sup>3,10,47</sup>

## 6.5 Identificación de los sitios de glicosilación y del sitio de unión a receptores en la Hemoaglutinina

Los resultados de acuerdo al servidor NetNGlyc 1.0 del CBS mostraron que hay cuatro sitios de glicosilación en la HA1 ubicados en las Asparaginas (Asn= N) 18, 34, 178, 310 y uno en la Asn 497 de la HA2 (figura 6). Cabe mencionar que en el alineamiento de todas las secuencias representativas de ambos linajes, se observa que los cinco sitios de glicosilación están altamente conservados en todos los virus analizados.

Se identificaron los aminoácidos que conforman el sitio de unión al receptor, los cuales se muestran en el cuadro 5. Los aminoácidos ubicados en las posiciones 146 a 150 y de la 237 a 242 que conforman esta estructura, están ampliamente conservados en todos los virus H4 analizados, provenientes de aves tanto de América del Norte como de Europa, Asia y Oceanía.

Por otro lado, el virus A/Swine/Ontario/01911-1/99 (H4N6), proveniente de un cerdo en América del Norte posee una Leucina en lugar de Glutamina y una Serina en lugar de Glicina en las posiciones 239 y 241 respectivamente.<sup>48</sup> Se sabe que estas mutaciones están asociadas al reconocimiento de receptores de ácido siálico con enlaces  $\alpha$  2-6 de galactosa<sup>20</sup>, lo anterior sugiere que el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) tiene mayor

afinidad por los receptores de ácido siálico con enlaces  $\alpha$  2-3 de galactosa, presentes predominantemente en el tracto respiratorio de las aves.

**Cuadro 5. Comparación de los aminoácidos presentes en el sitio de unión a receptores de la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con las secuencias consenso representativas de los virus aislados en América del Norte y aquellos aislados en Europa, Asia u Oceanía.** En el análisis se incluyó la secuencia de un virus aislado a partir de un cerdo en América del Norte A/Swine/Ontario/01911-1/99 (H4N6). Los aminoácidos asociados al reconocimiento de los receptores de ácido siálico con enlaces  $\alpha$  2-3 o  $\alpha$  2-6 de galactosa están sombreados en gris.

| Posición en H4                     | Sitio de Unión a Receptores |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                    | 110                         | 165 | 167 | 196 | 203 | 207 | 208 |
| A/ambiente/México/2011(H4N2)       | Y                           | W   | T   | H   | E   | L   | Y   |
| Consenso de América del Norte      | Y                           | W   | T   | H   | E   | L   | Y   |
| Consenso de Europa, Asia y Oceanía | Y                           | W   | V   | H   | E   | L   | Y   |
| A/Swine/Ontario/01911-1/99 (H4N6)  | Y                           | W   | T   | H   | E   | L   | Y   |

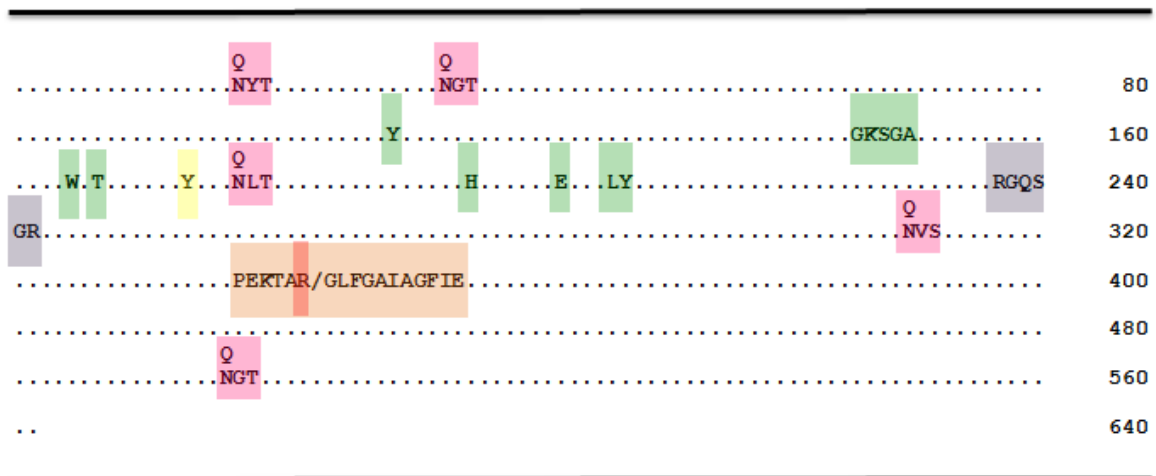
| Posición en H4                         | Extremo izquierdo del Sitio de Unión a Receptores |     |     |     |     |     |
|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 237   | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 |
| A/ambiente/México/2011(H4N2)           | R   | G   | Q   | S   | G   | R   |
| A/mallard//California/5495/2009 (H4N2) | R   | G   | Q   | S   | G   | R   |
| A/duck/Guangxi/912/2008 (H4N2)         | R   | G   | Q   | S   | G   | R   |
| A/Swine/Ontario/01911-1/99 (H4N6)      | R   | G   | L   | S   | S   | R   |

| Posición en H4                         | Extremo derecho del Sitio de Unión a Receptores |     |     |     |     |     |
|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 146   | 147 | 148 | 149 | 150 | 174 |
| A/ambiente/México/2011(H4N2)           | G   | K   | S   | G   | A   | Y   |
| A/mallard//California/5495/2009 (H4N2) | G   | K   | S   | G   | A   | Y   |
| A/duck/Guangxi/912/2008 (H4N2)         | G   | K   | S   | G   | A   | Y   |
| A/Swine/Ontario/01911-1/99 (H4N6)      | G   | K   | S   | G   | A   | Y   |

Los aminoácidos en los sitios 203 y 238 también están involucrados en la interacción con los receptores de ácido siálico en las células. La presencia de Ácido glutámico (Glu = E) y Glicina (Gly = G), como ocurre con el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), proveen especificidad hacia los receptores en aves,

mientras que la presencia de Ácido aspártico (Asp = D) en las mismas posiciones, respectivamente, originarían la interacción preferentemente con los receptores de ácido siálico predominantes en mamíferos.<sup>34,49</sup>

El aminoácido Tirosina ubicado en la posición 174 está conservado en todos los subtipos de HA y, aunque está fuera del sitio de unión a receptores, juega un papel crítico en el reconocimiento del virus por el receptor celular. Una mutación en esta posición, resulta en una reducción de la entrada del virus a la célula de hasta el 98%.<sup>50</sup> En la figura 7 se muestran: el sitio de unión a receptores y los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de los mismos en el hospedador, los posibles sitios de glicosilación, el péptido conector y el sitio de corte.



**Figura 7. Identificación en la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) del péptido conector, sitio de corte, sitios de glicosilación, sitio de unión a receptores y Tirosina en la posición 174.** El péptido conector está identificado en un recuadro anaranjado, el sitio de corte en un (recuadro rojo), los sitios de glicosilación en recuadros rosas, el borde derecho del sitio de unión a receptores en recuadros verdes y el borde izquierdo en recuadros morados y la Tirosina en la posición 174 en amarillo. Las Asn (N) glicosiladas están marcadas con Q.

## 6.6 Análisis de la Neuraminidasa y reconocimiento del dominio hidrofóbico en su estructura

La secuencia de 1426 nucleótidos, la cual pertenece al segmento 6 del genoma del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), codifica para el polipéptido NA de 469 aminoácidos. En el análisis de secuenciación se identificó una base mixta en el nucleótido 1310, que corresponde a una Guanina o a una Tirosina, que al momento de deducir la secuencia de aminoácidos origina una Arginina (Arg =R) o una Isoleucina (Ile = I) en el aminoácido 435 del polipéptido.

Al alinear las secuencias de NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) con aquellas pertenecientes a los virus subtipo H5N2 de alta patogenicidad indicados en el cuadro 6, se observa una delección de 20 aminoácidos que va desde la posición 63 hasta la 82 en los virus de alta patogenicidad, señalada en la figura 8; estos aminoácidos se ubican dentro del dominio hidrofóbico de la NA conocida como región tallo. Esta delección ha sido previamente descrita en la NA de virus considerados altamente virulentos en aves del orden *Galliformes*.<sup>35, 39, 51-53</sup>

**Cuadro 6. Virus de Influenza aviar utilizados para la comparación de sus respectivas Neuraminidasas.** Se indica en la columna 2 con un (-) si es de baja patogenicidad y con una (+) si es de alta patogenicidad. Asimismo, se indica la longitud en nucleótidos y la longitud del polipéptido en aminoácidos.

| Virus                                    | Virulencia | Longitud | No. de Acceso | Proteína |
|--|------------|----------|---------------|----------|
| A/ambiente/México/2011 (H4N2)            | -          | 1426 nt  | *             | 469 aa   |
| A/chicken/Queretero/14588-19/1995 (H5N2) | +          | 1381 nt  | ACL79940      | 449 aa   |
| A/Chicken/Puebla/8623-607/94 (H5N2)      | +          | 1371 nt  | AAR91531      | 449 aa   |



| HA                                | No. de Acceso | N2       |            |           |            |             |            |
|-----------------------------------|---------------|----------|------------|-----------|------------|-------------|------------|
| A/ambiente/México/2011            | H4            | -        | 50         | 60        | 70         | 80          | 90         |
| A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | H5            | ACL79940 | VPCEPIIIER | NITEIVLNN | TTIEKELCPE | IVEYRNWSKP  | QQQITGFAPF |
| A/Chicken/Puebla/8623-607/94      | H5            | AAR91531 | VPCEPIIIKR | NI-----   | -----      | ---DYRDWSKP | QQQITGFAPF |
|                                   |               |          | IPCEPIIIER | NI-----   | -----      | ---DYRNWSKP | QQQITGFAPF |

**Figura 8. Comparación de una parte de la secuencia de aminoácidos presentes en el dominio hidrofóbico de la NA entre dos virus de alta patogenicidad y el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).** Se observa la delección de 20 aminoácidos en las 2 secuencias de virus subtipo H5N2 de alta patogenicidad aislados a partir de pollo, al compararse con la secuencia H4N2 aislado a partir de agua. Parte del dominio hidrofóbico conocido como tallo está dentro del rectángulo punteado, mientras que las posiciones de las eliminaciones están sombreadas en gris y marcadas con guiones.

### 6.7 Identificación de mutaciones que confieren resistencia a fármacos antivirales en la NA

Se analizó la NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) para encontrar mutaciones asociadas a resistencia contra antivirales inhibidores de Neuraminidasa, y se determinó que este virus no presenta ninguna de ellas, lo cual sugiere que no es resistente hacia antivirales como Oseltamivir y Zanamivir. Los aminoácidos presentes en dichas posiciones están altamente conservados en todas las secuencias de virus analizadas del subtipo H4N2 (ver cuadro 7).

**Cuadro 7. Mutaciones en la NA asociadas a resistencia.** En la primera columna se encuentra señalada la posición del aminoácido donde ha sido descrita la mutación. En las siguientes 3 columnas se encuentran las secuencias analizadas; en la columna 5 está el o los aminoácidos asociados a resistencia. En las columnas 6 y 7 se señala con una (+) el subtipo en el que ha sido descrita la mutación y con un (-) si aún no ha sido descrita para ese subtipo. En la última columna se especifica hacia que antiviral está asociada dicha mutación, en donde la Z representa Zanamivir y la O representa Oseltamivir.

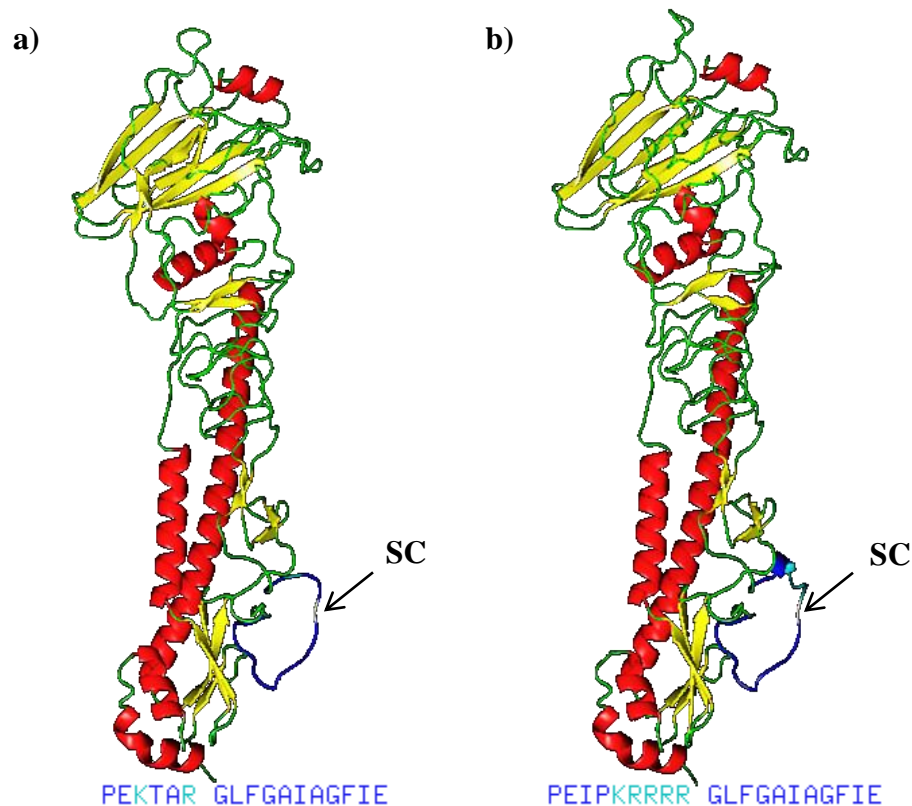
| Posición | Secuencias                       |                                     |   |                                       | Subtipos |    | Antiviral |
|----------|----------------------------------|-------------------------------------|---|---------------------------------------|----------|----|-----------|
|          | A/ambiente/México/2011<br>(H4N2) | Consenso de<br>América del<br>Norte | Consenso de<br>Europa,<br>Asia y<br>Oceanía | Mutación<br>asociada a<br>resistencia | N2       | N1 |           |
| 116      | V                                | V                                   | V   | A                                     | -        | +  | Z         |
| 117      | T                                | T                                   | T   | V                                     | -        | +  | O         |
| 118      | R                                | R                                   | R   | K                                     | +        | -  | Z         |
| 119      | E                                | E                                   | E   | V / I / G /<br>A / D                  | +        | +  | O, Z      |
| 136      | Q                                | Q                                   | Q   | L / K                                 | -        | +  | Z         |
| 151      | D                                | D                                   | D   | V                                     | +        | -  | Z         |
| 152      | R                                | R                                   | R   | K                                     | +        | +  | Z         |
| 198      | D                                | D                                   | D   | G / N                                 | -        | +  | O         |
| 222      | I                                | I                                   | I   | V / R / M<br>/ K / L                  | -        | +  | O         |
| 224      | R                                | R                                   | R   | K                                     | +        | -  | Z         |
| 274      | H                                | H                                   | H   | Y                                     | -        | +  | O         |
| 276      | E                                | E                                   | E   | D                                     | +        | -  | Z         |
| 292      | R                                | R                                   | R   | K                                     | +        | +  | O, Z      |
| 294      | N                                | N                                   | N   | S                                     | +        | +  | O         |
| 314      | S                                | S                                   | S   | V                                     | -        | +  | O         |
| 371      | R                                | R                                   | R   | K                                     | +        | -  | Z         |

## 6.8 Modelos tridimensionales de las proteínas HA y NA

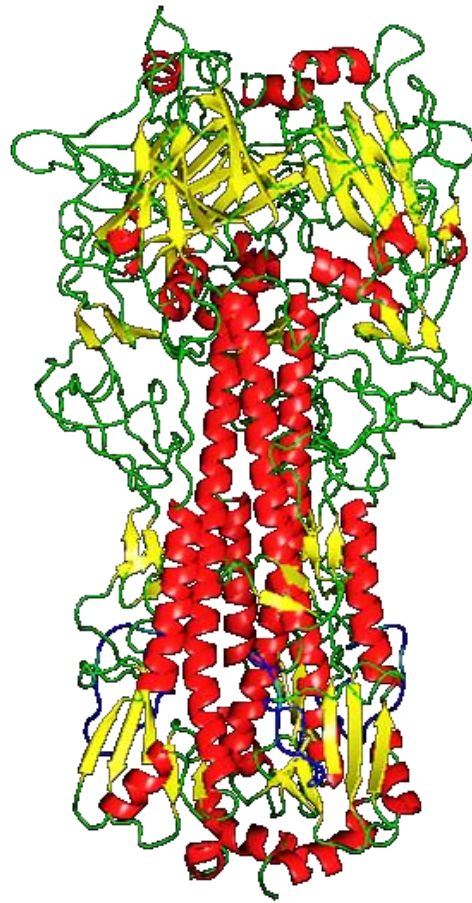
Se construyó el modelo de un monómero (figura 9 a) y del homotrímero (figura 10) de la HA del virus A/ambiente/México/2011(H4N2), utilizando como molde el modelo de la HA<sub>0</sub> precursora obtenido mediante cristalografía de rayos X por Chen *et al.*;<sup>17</sup> el modelo

creado mostró una identidad de 68.7% respecto a este y comprende desde el aminoácido 25 al 516 para su estructura tridimensional.

Se construyó el modelo de un monómero de la HA del virus A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) de alta patogenicidad (figura 9 b),<sup>44</sup> para mostrar el sitio de corte presente en un virus de alta patogenicidad y así compararlo con el sitio de corte del virus A/ambiente/México/2011(H4N2). En el cuadro 8 se muestran las diferencias entre ellos.



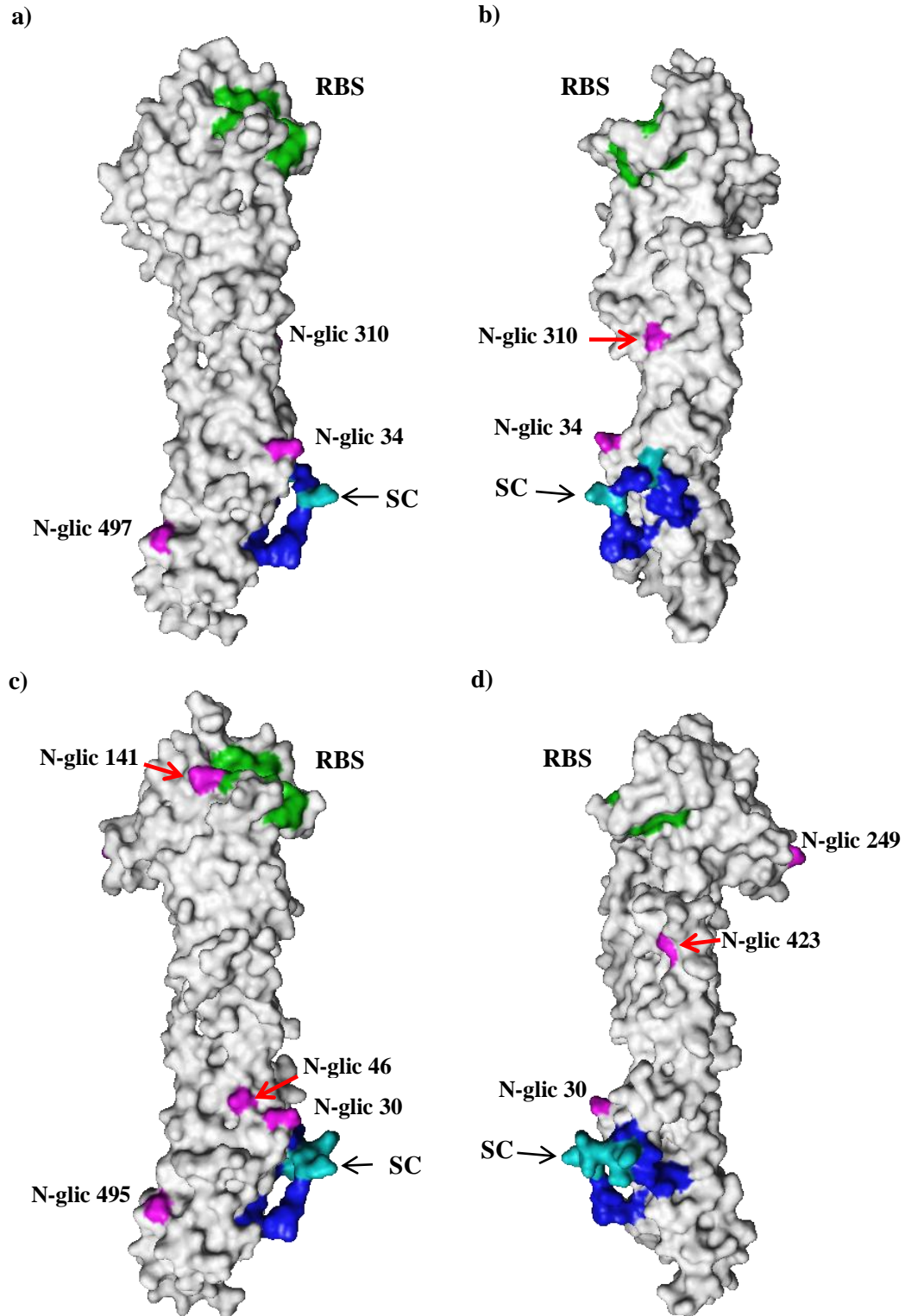
**Figura 9. Diagramas de Ribbon de uno de los 3 monómeros que conforman la HA previo al corte proteolítico de los virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) (a) y A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) (b).** En ambas figuras, el color rojo muestra las hélices  $\alpha$ , el amarillo las láminas  $\beta$  y el verde los rizos. En color azul se muestra el péptido conector, en el cual están marcados en turquesa los aminoácidos básicos presentes en el sitio de corte (Arginina: R y Lisina: K). La flecha señala la Arginina en la que se lleva a cabo el corte proteolítico (SC). Debajo de cada modelo se encuentra la secuencia de aminoácidos de acuerdo a la nomenclatura internacional.



**Figura 10. Diagrama de Ribbon que muestra al homotrímero HA<sub>0</sub> del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).** El color rojo muestra las hélices  $\alpha$ , el amarillo las láminas  $\beta$  y el verde los rizos. En azul está marcado el péptido conector de cada uno de los 3 monómeros que conforman la HA.

**Cuadro 8. Comparación entre las características de la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) y del virus A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) de alta patogenicidad.**

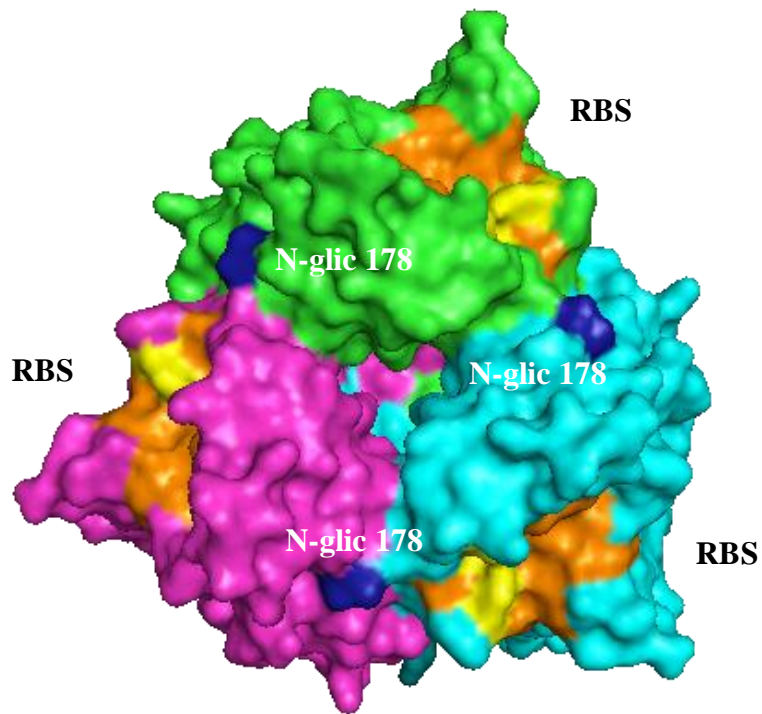
| A/ambiente/México/2011(H4N2)<br>Figura 11 a-b  | A/chicken/Netherlands/03010132/03(H7N7)<br>Figura 11 c-d  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Posee 5 sitios de glicosilación asociados a Asn: 4 en la HA<sub>1</sub>, en las posiciones 18, 34, 178 y 310; y 1 en la HA<sub>2</sub>, en la posición 497.</li> <li>• En el péptido conector hay 2 aminoácidos básicos.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Posee 6 sitios de glicosilación asociados a Asn: 4 en la HA<sub>1</sub>, en las posiciones 30, 46, 141 y 249; y 2 en la HA<sub>2</sub>, en las posiciones 423 y 495.</li> <li>• En el péptido conector hay 5 aminoácidos básicos.</li> </ul> |



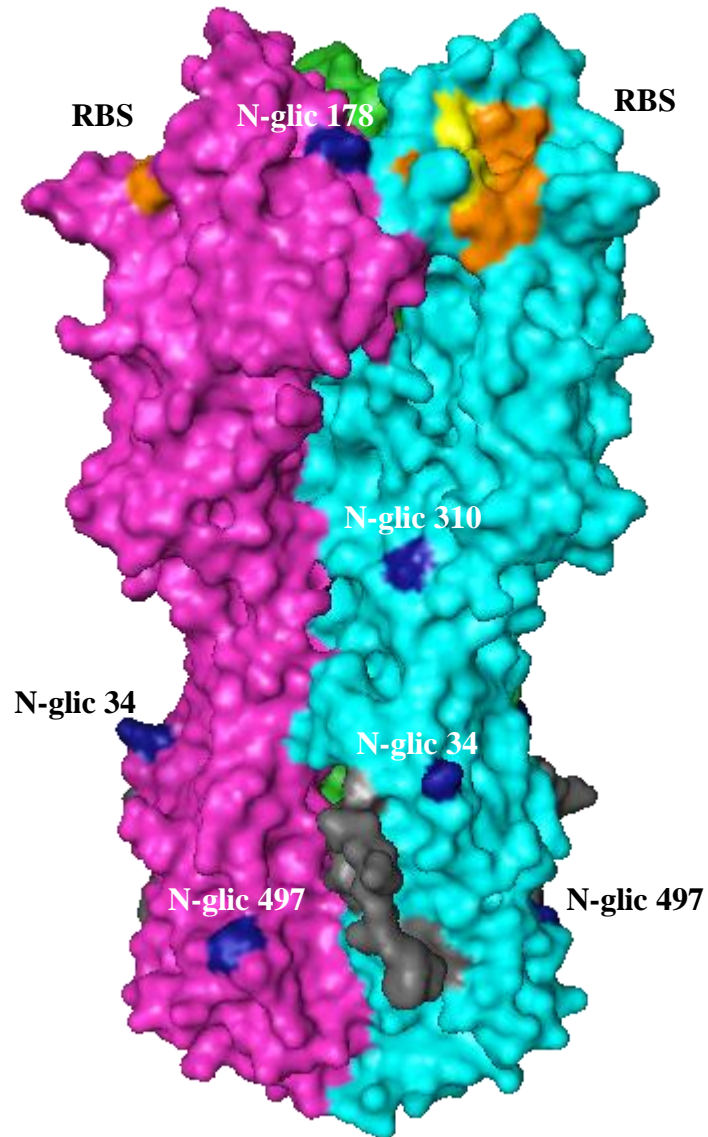
**Figura 11.** Vistas laterales de la estructura tridimensional de un monómero de la HA<sub>0</sub> de los virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) (a, b) y A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) (c, d). El sitio de unión a receptores (RBS) está marcado en verde, los sitios de glicosilación (N-glic) se

encuentran etiquetados y marcados en rosa, el péptido conector está marcado en azul y en él están marcados en turquesa los aminoácidos básicos, la flecha señala la Arginina donde se lleva a cabo el corte proteolítico (SC). Las características diferentes entre los modelos de ambos virus están señaladas con una flecha en rojo. Nótese que en la HA del virus A/chicken/Netherlands/03010132/03 (H7N7) el N-glic 141 está cercano al RBS y los aminoácidos básicos adicionales en el péptido conector exponen al sitio de corte.

En la estructura tridimensional del homotrímero de la HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) se observa la superficie molecular de la HA con el sitio de unión a receptores, los sitios de glicosilación y el sitio de corte marcados de acuerdo al código de colores descrito en las figuras 12 y 13.

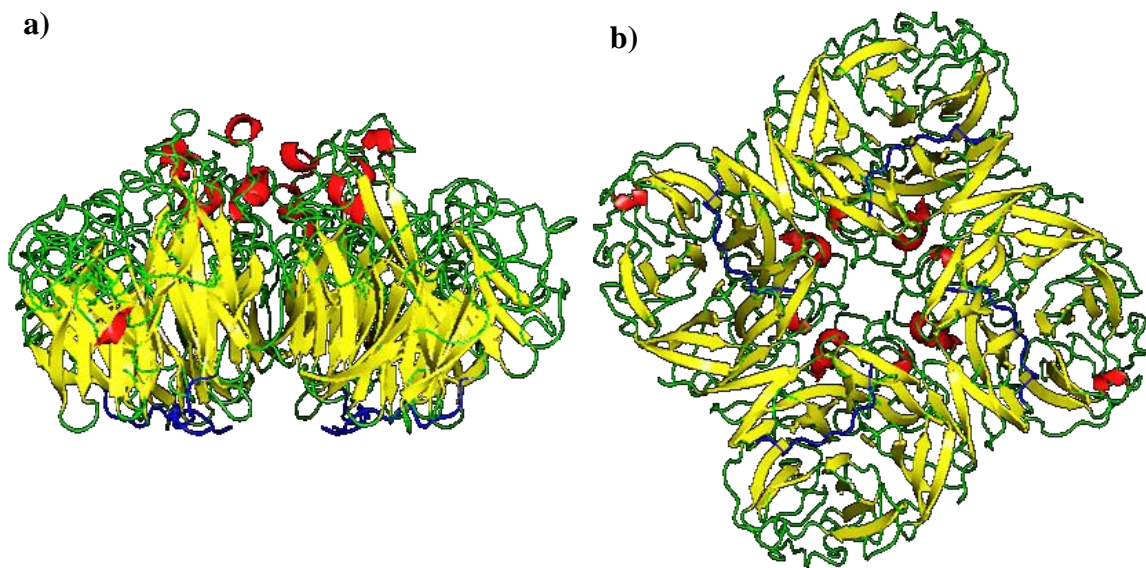


**Figura 12. Vista superior del modelo tridimensional del homotrímero HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).** Cada monómero está representado con un color diferente y tiene marcado: el sitio de unión a receptores (RBS) en naranja, los aminoácidos determinantes para la preferencia en la unión hacia los receptores de ácido siálico en amarillo y los sitios de glicosilación ligados a Asparagina (N-glic) etiquetados y marcados en azul.



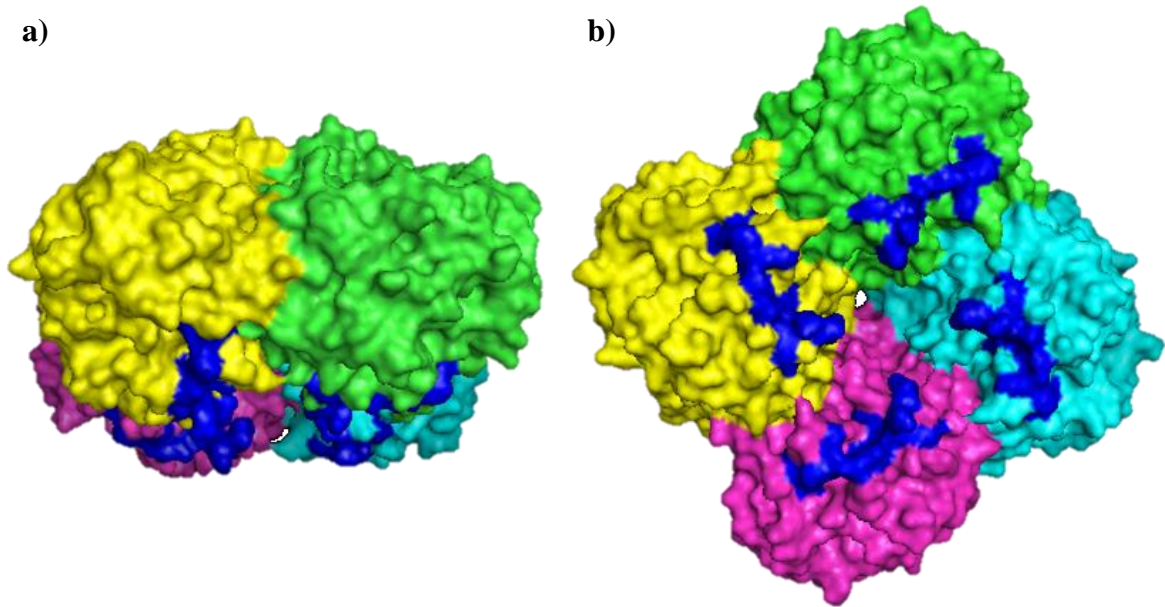
**Figura 13. Vista lateral del modelo tridimensional del homotrímero HA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).** Los sitios de glicosilación ligados a Asparagina están etiquetados y marcados en azul, el péptido conector con el sitio de corte están marcados en gris y el sitio de unión a receptores está marcado en naranja. Los aminoácidos determinantes para la preferencia en la unión hacia los receptores de ácido siálico en el hospedador están señalados en amarillo.

El homotetrámero que conforma la NA fue construido en base a un modelo del subtipo N2 obtenido por cristalografía de rayos X y depositado en el PDB con número de acceso 3tiaC<sup>54</sup>, con el 90.7% de similitud respecto al modelo de la NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2); el programa tomó en cuenta desde el aminoácido 82 al 469. En la figura 14 se muestra el diagrama de Ribbon y en la figura 15, la estructura tridimensional de la NA, donde se encuentra marcado en azul parte de la región tallo, pues esta comienza desde el aminoácido en la posición 36.



**Figura 14. Diagrama de Ribbon que muestra al homotetrámero NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).** Vista lateral (a) y vista inferior (b). El color rojo muestra las hélices  $\alpha$ , el amarillo las láminas  $\beta$  y el verde los rizos. En color azul se muestra la región del tallo para cada monómero.





**Figura 15. Vista lateral (a) e inferior (b) del modelo tridimensional de la NA del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2).** Cada monómero está representado en un color diferente, en azul se muestra parte del dominio hidrofóbico de la NA.

## VII. DISCUSIÓN

De acuerdo con lo esperado, las secuencias nucleotídicas de los segmentos 4 y 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), se agrupan con el linaje genético de los virus de Influenza Aviar aislados en América del Norte y no con aquellos aislados en Europa, Asia y Oceanía; este hecho concuerda con los análisis realizados por numerosos grupos de trabajo alrededor del mundo y en América del Norte, dedicados a la vigilancia epidemiológica del virus de Influenza Aviar.<sup>15, 55-57</sup> En estos se señala la baja prevalencia de la recombinación genética entre los virus de Influenza Aviar provenientes de Asia con los presentes en América del Norte, lo que ocurre al ser transportado por aves cuyo comportamiento migratorio abarca desde Asia hasta Estados Unidos y Canadá y que estas compartan el hábitat con aves susceptibles de infectarse.<sup>58</sup>

Se propone que la razón de esta baja prevalencia es la gran separación biogeográfica entre las aves acuáticas norteamericanas y las euroasiáticas.<sup>56</sup> Estas investigaciones se originaron tras los brotes ocurridos en Asia, Europa y África del subtipo H5N1 de Alta Patogenicidad en años recientes.<sup>35</sup> No obstante, se desconoce la frecuencia con la que ocurre un intercambio genético entre virus de baja patogenicidad de ambos hemisferios.

No obstante, como se muestra en el árbol filogenético del segmento 4 de este estudio, dentro del grupo 6 de secuencias nucleotídicas provenientes de aislamientos virales de América del Norte, se encuentra la secuencia A/duck/Taiwan/wb787/2005 (H4N2), este hallazgo también fue observado en el estudio realizado por Cheng *et al.*<sup>59</sup> en el que, como parte de un monitoreo de 10 años realizado en aves migratorias en Taiwán, se encontró que

una secuencia nucleotídica del segmento 4 subtipo H4N2, aislado de un pato golondrino (*Anas acuta*), se agrupa con las secuencias nucleotídicas provenientes de virus de América del Norte, sugiriendo así, aunque limitado, la presencia de un intercambio genético entre los virus de Influenza Aviar de ambos linajes.

En lo que respecta a México, durante la temporada migratoria de 2008 Montalvo-Corral M y Hernández J, durante un monitoreo de aves acuáticas silvestres en Sonora, comprueban la introducción de un virus subtipo H9 con 93% de similitud en relación a un virus proveniente de Asia.<sup>23</sup> Esto hace notar nuevamente el carácter esporádico de la introducción de virus pertenecientes al linaje de Europa, Asia y Oceanía a nuestro país. Es importante mencionar que no se ha encontrado un virus de Influenza Aviar en América del Norte cuyo genoma completo pertenezca al linaje de Europa, Asia y Oceanía.<sup>55</sup>

Al analizar los grupos formados en los dendrogramas de acuerdo a los nodos encontrados en la topología, las secuencias nucleotídicas de los segmentos 4 y 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) se ubican dentro de los grupos más alejados, es decir, con la mayor distancia entre grupos, del resto de aquellos que pertenecen al linaje de América del Norte, sin embargo, a su vez estos grupos también son los que poseen la mayor distancia respecto al grupo de secuencias provenientes de Europa, Asia y Oceanía; lo anterior corrobora la hipótesis de que el origen del virus estudiado se encuentra en América del Norte.

El hecho de que las distancias observadas dentro de los grupos 5 y 6 del árbol filogenético construido para el segmento 4, sean mayores al resto, probablemente sea

debido a que en el caso del grupo 6, aunque están dentro del mismo nodo, ambas secuencias pertenecen a distinto linaje, no así el caso del grupo 5, en el que las secuencias tienen una separación temporal cercana a 10 años entre los aislamientos.

Ha sido ampliamente debatido el papel de las aves acuáticas migratorias en el transporte de virus de Influenza Aviar dentro y entre los continentes; sin embargo, mediante monitoreos realizados alrededor de varios países, se ha demostrado ampliamente dicha participación, con restricción de la especie de ave y del subtipo del virus.<sup>56, 60-63</sup> De esta manera, el A/ambiente/México/2011 (H4N2), aislado en un humedal del Estado de México durante la temporada migratoria de patos, concuerda con ser uno de los subtipos más comúnmente encontrados en aves acuáticas del orden *Anseriformes* en América del Norte.<sup>55</sup>

Las secuencias bajo análisis de los segmentos 4 y 6 están más cercanamente relacionadas con las secuencias nucleotídicas provenientes de un virus aislado a partir de pato Pekín doméstico, lo que hace teóricamente posible que algunas de las introducciones de virus a nuestro país se lleven a cabo a través de la importación de aves domésticas e incluso tráfico ilegal de aves silvestres y de ornato; adicionalmente al transporte que podría ocurrir con la migración estacional de las aves acuáticas a México. Este hecho es reforzado con el hallazgo en 2005 de un virus subtipo H7N3 a partir de un *Anas cyanoptera*, en los humedales del Estado de México, cuyo análisis filogenético realizado por la CPA muestra un 100% de identidad con un virus de Influenza Aviar H7N3 aislado en Nueva York a partir de una codorniz en 2003.<sup>21</sup>

La inesperada agrupación de las secuencias de acuerdo al año en el que se aisló el virus muestra una correlación con la distancia genética entre las secuencias, hallazgo que se contrapone con lo encontrado por Donis OR, *et al.*<sup>46</sup> quienes en un análisis filogenético del subtipo H4, con virus provenientes de diferentes regiones del mundo, concluyen que el número de diferencias entre los nucleótidos no muestra correlación con el intervalo de tiempo en el que se aisló el virus. Una explicación para esto podría ser que, para su estudio, solamente se incluyeron 9 secuencias en el análisis filogenético originarias de virus aislados entre 1956 y 1985. En cambio, para realizar el presente estudio se seleccionaron 37 secuencias aisladas desde 1976 a 2009, lo que incrementa significativamente la oportunidad de observar dicha agrupación.

Es necesario realizar el análisis filogenético de los 8 segmentos del genoma para poder tener una mejor aproximación de la prevalencia de la recombinación genética que hay entre los virus de Influenza Aviar de América del Norte, incluyendo los presentes en México, con los virus de Europa, Asia y Oceanía. Pues, de acuerdo al estudio realizado por Dugan *et al.* al analizar 407 genomas completos de diferentes virus de América del Norte, observaron que el 6% de los virus analizados poseían al menos un segmento proveniente de un virus aislado en el otro hemisferio y que los segmentos genómicos que codifican para proteínas internas exhiben diferentes tasas de recombinación respecto a los otros que codifican para proteínas de superficie, incluso el patrón de recombinación parece aleatorio, presentando la mayor frecuencia de recombinación en el segmento 8 y la menor para el segmento 7.<sup>55</sup>

De acuerdo a estudios realizados en latitudes cercanas,<sup>23, 47, 55, 64</sup> dicho intercambio entre virus provenientes de ambos hemisferios probablemente ocurre en muy raras ocasiones debido a la dinámica de las poblaciones de aves acuáticas, que fungen como reservorios, en esta región geográfica, sumado a las condiciones ambientales más cálidas en general que las que ocurren a latitudes superiores.

Lo anterior se sustenta por un estudio realizado en Alaska en el que se muestrearon patos golondrinos (*Anas acuta*), cuya ruta migratoria es conocida por abarcar regiones de Asia como China, Corea y Japón e incluso llega a distribuirse durante el invierno hasta México y América Central<sup>65</sup>, (dejando a Alaska como punto de intersección entre ambos continentes) y obtuvieron una prevalencia significativamente más alta de recombinación genética entre virus de ambos linajes, proponiendo los autores que esto obedece a que estos mismos estudios realizados a latitudes inferiores están sujetos a un proceso de dilución, en cuanto las aves entran en contacto con virus pertenecientes al linaje de América del Norte, sugiriendo que los segmentos genómicos de virus euroasiáticos no le ofrecen ninguna ventaja de sobrevivencia.<sup>55, 61</sup>

Una evidencia más de la alta prevalencia de la recombinación entre los segmentos del virus de Influenza Aviar, es el hecho de que el segmento 4 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) tiene el mayor porcentaje de similitud con un virus aislado de pato Pekín. En cambio, el segmento 6 del mismo virus muestra un mayor porcentaje de similitud con un virus aislado a partir de un pato de collar silvestre en Estados Unidos. Sin embargo, se sugiere para estudios posteriores, hacer el mismo análisis con todos los segmentos genómicos del virus.

El análisis genético de virus considerados de Baja Patogenicidad puede servir como una aproximación para darle prioridad a ciertas especies dentro de un plan de vigilancia epidemiológica a largo plazo. De esta forma, se podrá rastrear y en dado caso, tomar medidas precautorias necesarias ante la introducción de un virus de Baja Patogenicidad H5 o H7, de los que es ampliamente reconocido el riesgo de presentar una mutación y convertirse en virus de Alta Patogenicidad.<sup>47, 66</sup>

Recientemente se han realizado varios aislamientos de virus de Influenza Aviar en países de América Central y América del Sur, como Guatemala, Argentina, Chile y Bolivia, para tener un mejor entendimiento de la ecología del virus en estas regiones del mundo. Debido a este esfuerzo de vigilancia epidemiológica se ha encontrado que los virus provenientes de América del Sur tienden a constituir un subgrupo genético distinto al de aquellos aislados en otras partes del mundo,<sup>67</sup> aunque siguen estando más cercanamente relacionados con aquellos provenientes de América del Norte.<sup>68</sup> No así los de América Central, los que están, sin lugar a dudas, filogenéticamente relacionados con aquellos provenientes de América del Norte, de acuerdo a los resultados obtenidos de la vigilancia epidemiológica mantenida de 2007 a 2010 en Guatemala.<sup>55, 64</sup>

Una vigilancia epidemiológica a largo plazo junto con la implementación de metodologías de muestreo sistemáticas, proveerán información útil que pueda servir para estimar el riesgo de dispersión de un virus e incluso trazar rutas predecibles de propagación que podrán asistir en el manejo del riesgo, e incluso, la mitigación oportuna de un brote en las poblaciones de aves silvestres y domésticas. Ejemplo de ello es el brote ocurrido

recientemente en junio de 2012 por el subtipo H7N3 en aves domésticas del estado de Jalisco, para el cual, se utilizaron como medidas de control del brote la eutanasia y la vacunación de las aves.<sup>69</sup> Como semilla para la elaboración de esta vacuna, se empleó el virus H7N3 aislado a partir de una cerceta canela en 2006, en las Ciénegas de Lerma, Estado de México por Cuevas-Domínguez *et al.* pues demostró tener mayor relación inmunológica con el virus que originó el reciente brote.<sup>69, 70</sup> Este mismo subtipo, había sido reportado en un brote de mayores dimensiones ocurrido en 2004 en Columbia Británica, Canadá y representó la despoblación de 19 millones de aves provenientes de 600 granjas comerciales y 11 producciones de traspatio dentro de la misma provincia.<sup>47</sup>

En cuanto al análisis de la HA, el sitio de corte corresponde al descrito para los virus de Baja Patogenicidad debido a que no cumple con ninguno de los criterios establecidos por la OIE<sup>70</sup>, los cuales describen a un virus de alta patogenicidad como aquellos de subtipo H5 o H7 que tengan un índice de patogenicidad intravenoso mayor a 1.2, o bien que causen al menos 75% de mortalidad en pollos de 4 a 8 semanas y que en la secuencia de la Hemoaglutinina tengan adicionados aminoácidos básicos en el sitio de corte. Aunque no se hizo la prueba de índice de patogenicidad intravenoso, la evidencia encontrada en su secuencia de aminoácidos señala que es un virus considerado de baja patogenicidad.

De acuerdo a lo esperado, se encontraron 5 sitios de glicosilación ligados a Asparagina en la HA, ya que en un estudio realizado por Donis, *et al.*<sup>46</sup> en el cual se analizaron las HA subtipo H4 de virus provenientes de diferentes hospedadores, regiones geográficas y años, se determinó que estos 5 sitios son conservados en la HA de este



subtipo, pues los oligosacáridos ligados al polipéptido son indispensables para dar estabilidad, mantener la conformación, el adecuado plegamiento, el transporte intracelular y modulación de la actividad biológica de la glicoproteína.<sup>71</sup>

Además, en otro estudio realizado con 104 secuencias de HA pertenecientes a los subtipos H1, H2, H3, H4, H5 y H7 se determinó que generalmente está presente sólo un sitio de glicosilación en el extremo superior de la HA<sub>1</sub> de virus aislados a partir de aves acuáticas silvestres, lo que sugiere que el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) proviene de las mismas, mientras que los virus aislados de aves domésticas presentan 2 o más en la misma región de la molécula; esto ha sido descrito principalmente para los subtipos H5 y H7.<sup>35</sup>

Dentro del mismo estudio, ningún aislamiento a partir de aves acuáticas mostró más de un sitio de glicosilación en esta región de la HA<sub>1</sub><sup>35</sup>, que corresponde a la posición 178 bajo la numeración del subtipo H4. Notablemente para las Hemoaglutininas H5 y H7 que poseen más de un sitio de glicosilación en el extremo superior de la HA<sub>1</sub> existe una alta correlación con la inserción de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte, indicando que son potencialmente virulentos para las aves domésticas, bajo el criterio establecido por la OIE.<sup>11</sup> Esto respalda lo encontrado en el presente estudio, en donde se encontraron 5 sitios de glicosilación en la HA, pero sólo 1 está presente en el extremo superior de la HA<sub>1</sub>, del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), además de la presencia de dos aminoácidos básicos en el sitio de corte, da lugar a un fenotipo considerado de baja virulencia.

Se corroboró que los aminoácidos que conforman el sitio de unión a receptores están ampliamente conservados, especialmente la Glutamina y Glicina en las posiciones 239 y 241 y Ácido glutámico y Glicina en las posiciones 203 y 238, respectivamente, en la HA de todos los virus que provienen de aves acuáticas de ambos linajes, incluido el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2). Lo anterior fue descrito por Bateman *et al.*<sup>33</sup> mediante la generación de virus con mutaciones dirigidas en dichas posiciones y ensayos de infectividad en cultivo celular, demostrando que estos aminoácidos en dichas posiciones tenían mayor afinidad a los receptores de ácido siálico con enlace  $\alpha$  2-3 de galactosa, presentes predominantemente en el tracto respiratorio de las aves, corroborando también que estos aminoácidos son los principales determinantes de la preferencia en la unión hacia los receptores de ácido siálico en el hospedador.<sup>49</sup>

En lo que respecta a la NA, y de acuerdo a lo esperado, no se identificaron deleciones en la región del “tallo” de la glicoproteína, esto aunado con la ausencia de sitios adicionales de glicosilación en la HA, corrobora que probablemente el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) proviene de aves acuáticas silvestres y no de aves domésticas como pollos y gallinas, ya que de acuerdo al estudio de Matrosovich, *et al.*<sup>35</sup> en el que identificaron virus con eliminaciones en la región “tallo” de la NA y a su vez también sitios de glicosilación adicionales en el extremo superior de la HA<sub>1</sub> en virus aislados de aves domésticas, sugiere que hay una interacción entre ambas características, especialmente en los virus aislados a partir de *Galliformes* de los subtipos H5 y H7. Este hallazgo indica que dichos cambios en las moléculas de superficie del virus: HA y NA, son

requeridos para la adaptación de los virus de Influenza provenientes de aves acuáticas silvestres hacia las aves domésticas como pollos y gallinas.

A este respecto, Li *et al.*<sup>53</sup> realizaron un análisis extenso de 4,920 secuencias de aminoácidos de 16 subtipos de NA y sólo observaron eliminaciones en el 45.5% de las secuencias analizadas (2,238) siendo los subtipos N1, N2 y N3 en los que se observaron eliminaciones con mayor frecuencia, pero sólo cuando coincide con los subtipos de Hemoaglutinina H5, H7 y H9, es decir las combinaciones entre ellos, particularmente en virus de los subtipos H5N1, H5N2, H7N1 y H7N2, corroborando los hallazgos de Matrosovich *et al.*<sup>35</sup>

Adicionalmente, en el mismo análisis de Li *et al.*<sup>53</sup> se observó que la mayor cantidad de virus con eliminaciones en la región “tallo” de la NA provienen de huéspedes del orden *Galliformes*, mientras que la menor cantidad provienen de huéspedes principalmente del orden *Anseriformes* y *Charadriiformes*. Cabe mencionar que los virus de estos órdenes provenían de patos domésticos y otros provenían de aves en mercados de aves vivas de especies exóticas a la región. Este hecho ratifica la hipótesis propuesta por este estudio respecto a que el origen más probable del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), encontrado en un humedal del Estado de México, se encuentra en aves acuáticas silvestres y no en aves domésticas pertenecientes al orden *Galliformes*, pues el virus carece de las características tanto en la HA como en la NA que distinguen a los virus que están adaptados a estas aves.

De acuerdo a la recopilación realizada por el Grupo de Trabajo con Antivirales de la Sociedad Internacional para la Influenza y otras Enfermedades Virales Respiratorias<sup>40</sup>, el

virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) no presenta ninguna mutación en la NA asociada a resistencia. Esto coincide con la escasa prevalencia (2.13%) encontrada en el estudio realizado por Orozovic *et al.*<sup>41</sup> para encontrar virus con dichas mutaciones, para ello se analizaron 6,221 secuencias de NA provenientes de virus aislados a partir de poblaciones de aves acuáticas silvestres y muestras ambientales, estas se obtuvieron a través de una campaña de muestreo con fines de vigilancia epidemiológica entre 2002 y 2008 en Europa y del banco de genes.

La ausencia de resistencia en el virus estudiado puede explicarse por la falta de contacto del mismo a concentraciones suficientes de antivirales en el agua de los humedales y, aunque esto no ha sido estudiado en nuestro país, se sabe que, en Estados Unidos, Reino Unido y Japón, el antiviral Oseltamivir logra alcanzar las concentraciones necesarias en cuerpos de agua para seleccionar variedades resistentes del virus, debido a que el consumo de ellos durante la temporada de invierno suele aumentar por su uso como tratamiento para Influenza estacional en humanos.<sup>72</sup>

Lo anterior señala la importancia de realizar estudios de bioacumulación de antivirales, mediante modelos hidrológicos, en cuerpos de agua prioritarios en México para el consumo humano, uso pecuario y como hábitat para las aves acuáticas migratorias; de esta forma se podrá evaluar el riesgo potencial de seleccionar poblaciones virales resistentes en el ambiente.

## VIII. CONCLUSIONES

- El análisis filogenético de los segmentos genómicos 4 y 6 del virus A/ambiente/México/2011 (H4N2) indica que está cercanamente relacionado con los virus de América del Norte y más alejado del linaje Euroasiático. Se sugiere hacer el análisis con el resto de los segmentos genómicos para monitorear la frecuencia de recombinación genética entre virus provenientes de ambos hemisferio a esta latitud.
- El virus estudiado presenta un fenotipo de baja virulencia pues: tiene un sitio de corte con dos aminoácidos básicos, no posee sitios de glicosilación adicionales en el extremo superior de la subunidad HA<sub>1</sub> de la HA y la NA no presenta eliminaciones en el dominio hidrofóbico.
- La evidencia sugiere que el sitio de unión a receptores del virus tiene preferencia por los receptores de ácido siálico con enlaces  $\alpha$  2-3 de galactosa, presentes predominantemente en el tracto respiratorio de las aves.
- Aparentemente el virus A/ambiente/México/2011 (H4N2), proviene de aves acuáticas pues sus glicoproteínas de superficie no presentan las adaptaciones que correlacionan con su adaptación a aves comerciales: presencia de sitios adicionales de glicosilación en la HA y eliminación en el dominio hidrofóbico de la NA.
- La NA del virus estudiado no presenta ninguna mutación asociada a resistencia a fármacos antivirales.
- Este trabajo describe una metodología utilizada para el análisis de un virus de Influenza Aviar utilizando herramientas de bioinformática, para predecir el posible origen, la virulencia y la resistencia a fármacos antivirales; para de esta forma, apoyar los estudios biológicos.

## VIII. REFERENCIAS

1. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [Página principal en internet]. San Diego: Virus Taxonomy List: 2011 Release c2012 [actualizado 2012; citado 2012 Marzo 19]. ICTV Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses; [alrededor de 6 pantallas]. Disponible desde:  
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>
2. LAMB AR, KRUG MR. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. En: KNIPE DM, HOWLEY PM, editores. Fundamental Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
3. ARIAS FC, ESCALERA ZM, SOTO RM, COBIÁN GA, ISA P, LÓPEZ S. Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1). Arch Med Res 2009; 40; 8; 643-654
4. TONG S, LI Y, RIVAILLER P, CONRARDY C, ALVAREZ-CASTILLO AD, CHEN ML, *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109; 11; 4269- 4274.
5. SWAYNE DE, HALVORSON DA. Influenza. En: SAIF YM, editor. Diseases of Poultry. 12 th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008.
6. STALLKNECHT ED, BROWN DJ. Ecology of Avian Influenza in Wild Birds. En: SWAYNE DE, editor. Avian Influenza. Iowa: Blackwell Publishing, 2008: 43- 58.
7. BECKER WB. The isolation and classification of Tern virus: influenza virus A/tern/South Africa/1961. Journal of Hygiene 1966; 64; 3; 309-320.
8. BROWN DJ, GOEKJIAN G, POULSON R, VALEIKA S, STALLKNECHT ED. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. Veterinary Microbiology 2009; 136; 20-26.
9. SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. Estrategias para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de las Aves Acuáticas y su Hábitat en México. México (D.F.): SEMARNAT, 2008.
10. SENNE AD, PANIGRAPHY B, KAWAOKA Y, PEARSON EJ, SÜSS J, LIPKIND M, *et al.* Survey of the Hemagglutinin (HA) Cleavage Site Sequence of H5 y H7 Avian Influenza Viruses: Amino Acid Sequence at the Cleavage Site as a Marker of Pathogenicity Potential. Avian Dis 1996; 40; 425-437.
11. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL [Página principal en internet]. París: Capítulo 10.4 Influenza Aviar c2012 [actualizado 2011; citado 2012 Marzo 19]. OIE Código Sanitario para los Animales Terrestres; [alrededor de 22 pantallas]. Disponible desde:  
[http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre\\_1.10.4.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_1.10.4.htm)

12. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD [página principal en Internet]. Bolivia: Oficina Nacional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud c 2012 [actualizado 2009 Mayo 4; citado 2012 Enero 8]. OMS: Últimas Noticias sobre la Gripe por A (H1N1) [aproximadamente 1 pantalla]. Disponible desde: <http://www.ops.org.bo/servicios/?DB=B&S11=16940&SE=SN>
13. PERDUE LM. Molecular Determinants of Pathogenicity for Avian Influenza Viruses. En: SWAYNE DE, editor. Avian Influenza. Iowa: Blackwell Publishing, 2008: 23- 41.
14. LEWIN B, editor. Genes IX. Massachusetts: Jones and Bartlett, 2006.
15. KRAUSS S, OBERT AC, FRANKS J, WALKER D, JONES K, SEILER P, *et al.* Influenza in Migratory Birds and Evidence of Limited Intercontinental Virus Exchange. PLoS Pathogens 2007; 3; 11; 1684-1693.
16. HE CQ, XIE ZX, HAN GZ, DONG JB, WANG D, LIU JB, *et al.* Homologous Recombination as an Evolutionary Force in the Avian Influenza A Virus. Mol Biol Evol 2009; 26; 1; 177-187.
17. CHEN J, LEE KH, STEINHAUER DA, STEVENS DJ, SKEHEL JJ, WILEY DC. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. Cell 1998; 95; 3: 409-417.
18. STEINHAUER AD. Role of the Hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of Influenza Virus. Cell 1998; 95; 3; 409-417.
19. NARRO RJ, MARTUSCELLI J, coordinadores. La UNAM ante una emergencia sanitaria, experiencia de la epidemia de influenza A (H1M1). México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
20. BATEMAN CA, BUSCH GM, KARASIN IA, BOVIN N, OLSEN WC. Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H4N6 Influenza Virus Determines Binding Affinity for  $\alpha$  2,6-Linked Sialic Acid and Infectivity Levels in Primary Swine and Human Respiratory Epithelial Cells. J Virol 2008; 82; 16; 8204-8209.
21. CUEVAS DE, GONZÁLEZ GS, QUINTANA LJ, LOZA RE, GONZÁLEZ RC, GARCÍA EG. Detección de orthomyxovirus H7N3 en anátidos del Estado de México. Red Vet [publicación en línea] 2009 Abril [citado 23 de Marzo de 2012]; 10 (4); [10 páginas]. Disponible desde: URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040409.html>
22. BARRÓN RRJ; Aislamiento e identificación de Myxovirus aviares en un humedal del Estado de México a partir de agua y patos centinelas (tesis de maestría). Lerma (Estado de México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.

23. MONTALVO CM, HERNÁNDEZ J. Genetic analysis of avian influenza virus from migratory waterfowl in Mexico. Arch Virol 2010; 155; 97-101.
24. OBREGÓN AAE; Condiciones hidrológicas *in situ* de un bordo con aves acuáticas migratorias durante el aislamiento del virus de Influenza tipo A (tesis de maestría). Lerma (Estado de México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
25. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION [página principal en Internet] Estados Unidos: BLAST: Basic Local Alignment Search Tool c1993-2012 [actualizado 2012 Julio 30; citado 2012 Agosto 04] NCBI-BLAST; [alrededor de 1 pantalla]. Disponible desde: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
26. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION [página principal en Internet] Estados Unidos: GenBank c1993-2012 [actualizado 2012 Agosto 27; citado 2012 Septiembre 05] NCBI-GenBank; [alrededor de 1 pantalla]. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
27. TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution (programa de computadora) version 5.0: 2011.
28. EXPERT PROTEIN ANALYSIS SYSTEM [página principal en internet]. Suiza: ExpASy c2012 [actualizado: 2011 Junio; citado 2012 Agosto 04]. SIB Swiss Institute of Bioinformatics; [alrededor de 1 pantalla]. Disponible desde: <http://web.expasy.org/translate/>
29. DUCKERT P, BRUNAK S, BLOM N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. Protein Eng Des Sel 2004; 17; 1: 107-112.
30. PREDICTION OF PROPROTEIN CONVERTASE CLEAVAGE SITES. [página principal en Internet]. Dinamarca: Center for Biological Sequence Analysis. Prediction Servers ProP 1.0 Server c2007 [actualizado: 2007 Marzo 08; citado 2012 Octubre 15]. CBS ProP 1.0 Server; [alrededor de 1 pantalla]. Disponible desde: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>
31. PREDICTION OF N-GLYCOSYLATION SITES IN HUMAN PROTEINS. [página principal en Internet]. Dinamarca: Center for Biological Sequence Analysis. Prediction Servers NetNGlyc 1.0 Server c2011 [actualizado 2011 Septiembre 13; citado 2012 Octubre 15] CBS NetNGlyc 1.0 Server; [alrededor de 1 pantalla]. Disponible desde: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
32. ZHANG M, GASCHEN B, BLAY W, FOLEY B, HAIGWOOD N, KUIKEN C, et al. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. Glycobiology 2004; 14;12: 122 9-1246.



33. BATEMAN CA, BUSCH GM, KARASIN IA, BOVIN N, OLSEN WC. Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H4N6 Influenza Virus Determines Binding Affinity for  $\alpha$  2,6-Linked Sialic Acid and Infectivity Levels in Primary Swine and Human Respiratory Epithelial Cells. *J Virol* 2008; 82; 16; 8204-8209.
34. GLASER L, STEVENS J, ZAMARIN D, WILSON AI, GARCÍA-SASTRE A, TUMPEY MT, *et al.* A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity. *J Virol* 2005; 79; 17; 11533-1536.
35. MATROSOVICH M, ZHOU N, KAWAOKA Y, WEBSTER R. The surface glycoproteins of H5 Influenza Viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 1999; 73; 2: 1146-1155.
36. OBENAUER JC, DENSON J, MEHTA PK, SU X, MUKATIRA S, FINKELSTEIN DB. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 2006; 311; 5767: 1576-1580.
37. ABED Y, NEHMÉ B, BAZ M, BOIVIN G. Activity of the neuraminidase inhibitor A-315675 against oseltamivir-resistant influenza neuraminidases of N1 and N2 subtypes. *Antiviral Research* 2008; 77; 163- 166.
38. BAZ M, ABED Y, BOIVIN G. Characterization of drug-resistant recombinant influenza A/H1N1 viruses selected in vitro with peramivir and zanamivir. *Antiviral Research* 2007; 74; 159- 162.
39. MISHIN VP, NOVIKOV D, HAYDEN FG, GUBAREVA LV. Effect of Hemagglutinin glycosylation of Influenza virus susceptibility to Neuraminidase inhibitors. *J Virol* 2005; 79; 19: 12416-12424.
40. INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFLUENZA AND OTHER RESPIRATORY VIRUS DISEASES. [Página principal en Internet]. Table of Neuraminidase resistance mutations. C 1999-2012 [actualizado 2012 Abril 18; citado 2012 Octubre 31] ISIRV: Antiviral Group; [1 pantalla]. Disponible desde: [http://www.isirv.org/site/images/stories/avg\\_documents/Resistance/mutations\\_18.04.12.pdf](http://www.isirv.org/site/images/stories/avg_documents/Resistance/mutations_18.04.12.pdf)
41. OROZOVIC G, OROZOVIC K, LENNERSTRAND J, OLSEN B. Detection of resistance mutations to antivirals Oseltamivir and Zanamivir in avian influenza A viruses isolated from wild birds. *PLoS ONE* 2011; 6; 1: 1-10.
42. SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. [Página principal en Internet]. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. C 2006 [actualizado 2012 Noviembre 11; citado 2012 Noviembre 11] SIB; [1 pantalla]. Disponible desde: <http://swissmodel.expasy.org/?pid=smh01>.

43. PROTEIN DATA BANK. [Página principal en Internet]. Biological Macromolecular Resource. C 2012 [actualizado 2012 Noviembre; citado 2012 Diciembre] PDB; [1 pantalla]. Disponible desde: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
44. DE WIT E, MUNSTER VJ, VAN RIEL D, BEYER WE, RIMMELZWAAN GF, KUIKEN T, *et al.* Molecular determinants of adaptation of highly pathogenic avian influenza H7N7 viruses to efficient replication in the human host. *J Virol* 2010; 84; 3; 1597-1606.
45. THE PyMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM, VERSION 1.5.0.4. [Página principal en Internet]. Japón: Schrödinger LLC C 2005-2012 [actualizado 2012 Agosto 21; citado 2012 Noviembre 12] PyMOL; [2 pantallas]. Disponible desde: <http://www.pymol.org/>
46. DONIS OR, BEAN JW, KAWAOKA Y, WEBSTER GR. Distinct Lineages of Influenza Virus H4 Hemagglutinin Genes in Different Regions of the World. *Virology* 1989; 169; 408-417.
47. DENNIS JA. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 2007; 25; 5637-5644.
48. WISEDCHANWET T, WONGPHATCHARACHAI M, BOONYAPISITSOPA S, BUNPAPONG N, KITIKOON P, AMONSIN A. Genetic characterization of avian influenza subtype H4N6 and H4N9 from live bird market, Thailand. *Virol J* 2011; 21; 1-8.
49. TUMPEY MT, MAINES RT, VAN HOEVEN N, GLASER L, SOLÓRZANO A, PAPPAS C, *et al.* A Two-Amino Acid Change in the Hemagglutinin of the 1918 Influenza Virus Abolishes Transmission. *Science* 2007; 315; 655-659.
50. WANG M, TSCHERNE MD, MC CULLOUGH C, CAFFREY M, GARCÍA-SASTRE A, RONGA L. Residue Y161 of Influenza Virus Hemagglutinin Is Involved in Viral Recognition of Sialylated Complexes from Different Hosts. *J Virol* 2012; 86; 8; 4455-4462.
51. CASTRUCCI RM, KAWAOKA Y. Biologic importance of Neuraminidase stalk length in Influenza A virus. *J Virol* 1993; 67; 2: 759-764.
52. BAIGENT SJ, MC CAULEY JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 2001; 79: 177-185.
53. LI J, ZU DOHNA H, CARDONA CJ, MILLER J, CARPENTER TE. Emergence and genetic variation of neuraminidase stalk deletions in avian influenza viruses. *PLoS One* 2011; 6; 2: 1-11.

54. VAVRICKA CJ, LI Q, WU Y, QI J, WANG M, LIU Y, *et al.* Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathog* 2011; 7; 10: 1-10.
55. DUGAN GV, CHEN R, SPIRO JD, SENGAMALAY N, ZABORSKY J, GHEDIN E, *et al.* The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. *PLoS Pathogens* 2008; 4; 5; 1-9.
56. PEARCE MJ, RAMEY MA, FLINT LP, KOEHLER VA, FLESKES PJ, FRANSON CJ, *et al.* Avian Influenza at both ends of a migratory flyway: characterizing viral genomic diversity to optimize surveillance plans for North America. *Evolutionary Applications* 2009; 2; 4; 457-468.
57. WINKER K, MC-CRACKEN KG, GIBSON DD, PRUETT LC, MEIER R, HUETTMANN F, *et al.* Movements of Birds and Avian Influenza from Asia into Alaska. *Emerg Infect Dis* 2007; 13; 4: 547-552.
58. RAMEY MA, PEARCE MJ, ELY RC, SHEFFIELD-GUY ML, IRONS BD, DERKSEN VD, *et al.* Transmission and reassortment of avian influenza viruses at the Asian–North American interface. *Virology* 2010; 406; 2: 352-359.
59. CHENG MC, LEE MS, HO YH, CHYI WL, WANG CH. Avian Influenza Monitoring in Migrating Birds in Taiwan During 1998–2007. *Avian Dis* 2012; 54; 1: 109-114.
60. SPACKMAN E, STALLKNECHT ED, SLEMONS DR, WINKER K, SUAREZ L, SCOTT M, *et al.* Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation. *Virus Res* 2005; 114: 89-100.
61. KOEHLER VA, PEARCE MJ, FLINT LP, FRANSON CJ, IP SH. Genetic evidence of intercontinental movement of avian influenza in a migratory bird: the northern pintail (*Anas acuta*). *Molecular Ecology* 2008; 17: 4754-4762.
62. BUI NV, OGAWA H, KARIBE K, MATSUO K, NGUYEN HT, AWAD SA, *et al.* Surveillance of Avian Influenza Virus in Migratory Water Birds in Eastern Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 2011; 73; 2: 209-215
63. WARD PM, MAFTEI ND, APOSTU LC, SURU RA. Association Between Outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza Subtype H5N1 and Migratory Waterfowl (Family *Anatidae*) Populations. *Zoonoses Public Health* 2009; 56; 1: 1-9.
64. GONZÁLEZ-REICHE SA, MORALES-BETOULLE EM, ÁLVAREZ D, BETOULLE JL, MÜLLER LM, SOSA MS, *et al.* Influenza A Viruses from Wild Birds in Guatemala Belong to the North American Lineage. *PLoS ONE* 2012; 7; 3: 1-11.

65. THE BIRDS OF NORTH AMERICA [Página principal en internet]. Northern Pintail, *Anas acuta*. C 2012 [actualizado 1995; citado 2012 Noviembre 3]. Cornell Lab of Ornithology; [alrededor de 2 pantallas]. Disponible desde: <http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/163/articles/introduction>
66. HORIMOTO T, RIVERA E, PEARSON J, SENNE D, KRAUSS S, KAWAOKA Y, *et al.* Origin and molecular changes associated with emergence of HP H5N2 en México. *Virology* 1995; 213; 1: 223-230.
67. PEREDA AJ, UHART M, PÉREZ AA, ZACCAGNINI ME, LA SALA L, DECARRE J, *et al.* Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: Evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology* 2008; 378; 2: 363-370.
68. SPACKMAN E, MC CRACKEN KG, WINKER K, SWAYNE DE. H7N3 Avian Influenza Virus Found in a South American Wild Duck Is Related to the Chilean 2002 Poultry Outbreak, Contains Genes from Equine and North American Wild Bird Lineages, and Is Adapted to Domestic Turkeys. *J Virol* 2006; 80; 15: 7760-7764.
69. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INCOUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA [Página principal en Internet]. Comunicados de Prensa: Influenza Aviar. C 2012 [actualizado 2012 Noviembre 21; citado 2012 Noviembre 23]. SAGARPA-SENASICA; [alrededor de 4 pantallas]. Disponible desde: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4663>
70. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL [Página principal en internet]. Actualización sobre la Influenza Aviar altamente patógena en animales tipo H5 y H7. C 2012 [actualizado 2012 Noviembre 15; citado 2012 Noviembre 18]. OIE Código Sanitario para los Animales Terrestres; [alrededor de 3 pantallas]. Disponible desde: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2012/>
71. ROBERTS PC, GARTEN W, KLENK HD. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J Virol* 1993; 67; 6: 3048-3060
72. SINGER AC, NUNN MA, GOULD EA, JOHNSON AC. Potential Risks Associated with the Proposed Widespread Use of Tamiflu. *Environ Health Perspect* 2007; 115; 1: 102-106.
73. EKINS S, MESTRES J, TESTA B. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol* 2007; 152; 1; 9-20.
74. NEI M, KUMAR S. Perspectives. En: NEI M, KUMAR S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Nueva York: Oxford University Press, 2000.

## **IX. ANEXOS**

- I. Secuencias utilizadas para realizar el análisis filogenético del segmento 4, obtenidas de acuerdo a la disponibilidad en GenBank y con los criterios establecidos en la metodología.
  
- II. Secuencias utilizadas para realizar el análisis filogenético del segmento 6, obtenidas de acuerdo a la disponibilidad en GenBank y con los criterios establecidos en la metodología.
  
- III. Claves de las secuencias incluidas en los cálculos de distancias genéticas para el segmento 4 y el segmento 6.
  
- IV. Distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos del segmento 4.
  
- V. Distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos del segmento 6.



**Anexo I. Secuencias utilizadas para realizar el análisis filogenético del segmento 4, obtenidas de acuerdo a la disponibilidad en GenBank y con los criterios establecidos en la metodología.**

En el cuadro se muestran el subtipo, el hospedero, el país, la ciudad, la fecha de colección y el tamaño de la secuencia, además del número de acceso para cada una. La secuencia con (\*) pertenece al virus A/ambiente/México/2011(H4N2).

| Subtipo | Hospedero                            | País   | Ciudad           | Tamaño de secuencia | Colección de muestra | Número de Acceso |
|---------|--------------------------------------|--------|------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| H4N2    | Ambiente                             | México | Estado de México | 1709 pb             | 2011-02-28           | *                |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | Wisconsin        | 1712 pb             | 2009-10-17           | CY097478         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>                  | EUA    | Wisconsin        | 1713 pb             | 2009-10-17           | CY097470         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | Wisconsin        | 1711 pb             | 2009-10-04           | CY097446         |
| H4N2    | <i>Anas clypeata</i>                 | EUA    | Wisconsin        | 1713 pb             | 2009-10-03           | CY097430         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>                  | EUA    | Wisconsin        | 1713 pb             | 2009-10-17           | CY097018         |
| H4N2    | <i>Anas rubripes</i>                 | EUA    | Wisconsin        | 1713 pb             | 2009-10-05           | CY096978         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | California       | 1713 pb             | 2009-07-27           | CY094669         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | California       | 1713 pb             | 2009-07-23           | CY094637         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> | EUA    | California       | 1701 pb             | 2006-03-06           | CY053821         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>                  | EUA    | Minnesota        | 1664 pb             | 2008-09-01           | CY043062         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | South Dakota     | 1678 pb             | 2008-08-19           | CY042368         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>                  | EUA    | Minnesota        | 1654 pb             | 2008-08-20           | CY042348         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | Canadá | Alberta          | 1738 pb             | 1979-08-07           | CY005954         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | Canadá | Alberta          | 1738 pb             | 1984-08-06           | CY005959         |
| H4N2    | <i>Anas crecca carolinensis</i>      | EUA    | Ohio             | 1704 pb             | 1986-10-30           | CY015459         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | Ohio             | 1704 pb             | 2002-08-19           | CY020805         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | Ohio             | 1704 pb             | 1987-10-19           | CY011056         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | Canadá | Alberta          | 1704 pb             | 1979                 | AB292406         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>            | EUA    | Ohio             | 1704 pb             | 1989-10-19           | CY016148         |

|      |                            |              |                 |         |            |          |
|------|----------------------------|--------------|-----------------|---------|------------|----------|
| H4N2 | <i>Anas discors</i>        | Canadá       | Alberta         | 1738 pb | 1979-08-11 | CY005955 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Canadá       | Alberta         | 1738 pb | 1978-08-10 | CY005953 |
| H4N2 | <i>Anas acuta</i>          | Canadá       | Alberta         | 1738 pb | 1979-08-11 | CY005956 |
| H4N2 | <i>Anas discors</i>        | EUA          | Nueva York      | 1738 pb | 1979-11-20 | CY014922 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | EUA          | Ohio            | 1704 pb | 1989-10-19 | CY012816 |
| H4N2 | <i>Meleagris gallopavo</i> | EUA          | Minnesota       | 1738 pb | 1979-09-01 | CY014751 |
| H4N2 | <i>Meleagris gallopavo</i> | EUA          | Minnesota       | 1738 pb | 1980       | M25290   |
| H4N2 | <i>Anas discors</i>        | Canadá       | Nuevo Brunswick | 1712 pb | 2009-09-14 | CY125581 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Canadá       | Ontario         | 1700 pb | 2005-08-22 | CY095299 |
|      |                            |              |                 |         |            |          |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | China        | Hunan           | 1725 pb | 2009       | HQ285886 |
| H4N2 | Ave                        | Japón        | Hokkaido        | 1713 pb | 2008-10-08 | CY088721 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | China        | Guangxi         | 1738 pb | 2008       | CY076892 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Países Bajos | Países Bajos    | 1718 pb | 2007       | CY076921 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Taiwan       | Taiwan          | 1738 pb | 2005       | GU066561 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Taiwan       | Taiwan          | 1738 pb | 1998       | GU066542 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Australia    | Victoria        | 1702 pb | 1994       | CY045247 |
| H4N2 | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Hong Kong    | Hong Kong       | 1738 pb | 1976       | CY006030 |

**Anexo II. Secuencias utilizadas para realizar el análisis filogenético del segmento 6, obtenidas de acuerdo a la disponibilidad en GenBank y con los criterios establecidos en la metodología.**

En el cuadro se muestran el subtipo, el hospedero, el país, la ciudad, la fecha de colección y el tamaño de la secuencia, además del número de acceso para cada una. La secuencia con (\*) pertenece al virus A/ambiente/México/2011(H4N2).

| Subtipo | Hospedero                       | País   | Ciudad           | Tamaño de secuencia | Colección de muestra | Número de Acceso |
|---------|---------------------------------|--------|------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| H4N2    | Ambiente                        | México | Estado de México | 1426 pb             | 2011-02-28           | *                |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | Wisconsin        | 1442 pb             | 2009-10-17           | CY097480         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>             | EUA    | Wisconsin        | 1442 pb             | 2009-10-17           | CY097472         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | Wisconsin        | 1442 pb             | 2009-10-04           | CY097448         |
| H4N2    | <i>Anas clypeata</i>            | EUA    | Wisconsin        | 1442 pb             | 2009-10-03           | CY097432         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>             | EUA    | Wisconsin        | 1442 pb             | 2009-10-17           | CY097020         |
| H4N2    | <i>Anas rubripes</i>            | EUA    | Wisconsin        | 1442 pb             | 2009-10-05           | CY096980         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | California       | 1440 pb             | 2009-07-27           | CY094671         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | California       | 1439 pb             | 2009-07-23           | CY094639         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>             | EUA    | Minnesota        | 1398 pb             | 2008-08-20           | CY055108         |
| H4N2    | <i>Anas discors</i>             | EUA    | Minnesota        | 1396 pb             | 2008-09-01           | CY054538         |
| H4N2    | <i>Pato Pekin</i>               | EUA    | California       | 1416 pb             | 2006-03-06           | CY053823         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | South Dakota     | 1400 pb             | 2008-08-19           | CY048780         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | Minnesota        | 1441 pb             | 1998                 | FJ517302         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | Canadá | Alberta          | 1466 pb             | 1979-08-07           | CY004792         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | Canadá | Alberta          | 1467 pb             | 1984-08-06           | CY004832         |
| H4N2    | <i>Anas crecca carolinensis</i> | EUA    | Ohio             | 1434 pb             | 1986-10-30           | CY015461         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | Ohio             | 1434 pb             | 2002-08-19           | CY020807         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | EUA    | Ohio             | 1433 pb             | 1987-10-19           | CY011058         |
| H4N2    | <i>Anas platyrhynchos</i>       | Canadá | Alberta          | 1430 pb             | 1979                 | AB292407         |



|       |                            |              |                 |         |            |          |
|-------|----------------------------|--------------|-----------------|---------|------------|----------|
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | EUA          | Ohio            | 1434 pb | 1989-10-19 | CY016150 |
| H4N2  | <i>Anas discors</i>        | Canadá       | Alberta         | 1466 pb | 1979-08-11 | CY004799 |
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Canadá       | Alberta         | 1467 pb | 1978-08-10 | CY004785 |
| H4N2  | <i>Anas acuta</i>          | Canadá       | Alberta         | 1466 pb | 1979-08-11 | CY004806 |
| H4N2  | <i>Anas discors</i>        | EUA          | Nueva York      | 1467 pb | 1979-11-20 | CY014923 |
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | EUA          | Ohio            | 1434 pb | 1989-10-19 | CY012818 |
| H4N2  | <i>Meleagris gallopavo</i> | EUA          | Minnesota       | 1467 pb | 1979-09-01 | CY005908 |
| H4N2  | <i>Anas discors</i>        | Canadá       | Nuevo Brunswick | 1439 pb | 2009-09-14 | CY125583 |
| Mixto | <i>Anas platyrhynchos</i>  | EUA          | Mississippi     | 1416 pb | 2010-01-16 | CY097754 |
|       |                            |              |                 |         |            |          |
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | China        | Hunan           | 1467 pb | 2009       | HQ285888 |
| H4N2  | Ave                        | Japón        | Hokkaido        | 1410 pb | 2008-10-08 | CY088723 |
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | China        | Guangxi         | 1467 pb | 2008       | CY076894 |
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Países Bajos | Países Bajos    | 1453 pb | 2007       | CY076923 |
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Australia    | Victoria        | 1434 pb | 1994       | CY045249 |
| H4N2  | <i>Anas platyrhynchos</i>  | Hong Kong    | Hong Kong       | 1467 pb | 1976       | CY005626 |

**Anexo III. Claves de las secuencias incluidas en los cálculos de distancias genéticas para el segmento 4 y el segmento 6.**

| Región                 | Clave      |   | Virus  |
|------------------------|------------|---|--|
|                        | Segmento 4 | Segmento 6  |  |
| América del Norte      | 1          | 1   | A/ambiente/México/2011(H4N2)                     |
|                        | -          | 2   | A/mallard/Mississippi/407/2012(mixed)            |
|                        | 2          | 3   | A/pekin duck/California/P30/2006(H4N2)           |
|                        | 3          | 4   | A/mallard/Alberta/223/1979(H4N2)                 |
|                        | 4          | 5   | A/mallard duck/ALB/354/1978(H4N2)                |
|                        | 5          | 6   | A/mallard duck/ALB/106/1979(H4N2)                |
|                        | 6          | 7   | A/blue-winged teal/ALB/580/1979(H4N2)            |
|                        | 7          | 8   | A/pintail duck/ALB/599/1979(H4N2)                |
|                        | 8          | 9   | A/mallard duck/ALB/630/1984(H4N2)                |
|                        | 9          | 10  | A/turkey/Minnesota/833/1980(H4N2)                |
|                        | 10         | -   | A/turkey/Minnesota/833/1980(H4N2)                |
|                        | 11         | 11  | A/blue-winged teal/New York/370ac/1979(H4N2)     |
|                        | 12         | 12  | A/green-winged teal/Ohio/344/1986(H4N2)          |
|                        | 13         | 13  | A/mallard/Ohio/94/1989(H4N2)                     |
|                        | 14         | 14  | A/mallard/Ohio/686/2002(H4N2)                    |
|                        | 15         | 15  | A/mallard/Ohio/97/1989(H4N2)                     |
|                        | 16         | 16  | A/mallard/Ohio/275/1987(H4N2)                    |
|                        | 17         | 17  | A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-00452/2008(H4N2) |
|                        | 18         | 18  | A/mallard/South Dakota/Sg-00457/2008(H4N2)       |
|                        | 19         | 19  | A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-00798/2008(H4N2) |
|                        | 20         | -   | A/mallard/Ontario/15882/2005(H4N2)               |
|                        | 21         | 20  | A/mallard/California/5192/2009(H4N2)             |
|                        | 22         | 21  | A/mallard/California/5495/2009(H4N2)             |
|                        | 23         | 22  | A/American black duck/Wisconsin/2542/2009(H4N2)  |
|                        | 24         | 23  | A/blue-winged teal/Wisconsin/2713/2009(H4N2)     |
|                        | 25         | 24  | A/northern shoveler/Wisconsin/2508/2009(H4N2)    |
|                        | 26         | 25  | A/blue-winged teal/Wisconsin/2665/2009(H4N2)     |
|                        | -          | 26  | A/mallard/Minnesota/371/1998(H4N2)               |
|                        | 27         | 27  | A/mallard/Wisconsin/2719/2009(H4N2)              |
| 28                     | 28         | A/mallard/Wisconsin/2530/2009(H4N2)               |  |
| 29                     | 29         | A/blue-winged teal/New Brunswick/03756/2009(H4N2) |  |
| Europa, Asia y Oceanía | 30         | 30  | A/duck/Victoria/D23/1994(H4N2)                   |
|                        | 31         | -   | A/duck/Taiwan/wb1/1998(H4N2)                     |
|                        | 32         | -   | A/duck/Taiwan/wb787/2005(H4N2)                   |
|                        | 33         | 31  | A/duck/Hunan/8-19/2009(H4N2)                     |
|                        | 34         | 32  | A/duck/Hong Kong/24/1976(H4N2)                   |
|                        | 35         | 33  | A/duck/Guangxi/912/2008(H4N2)                    |
|                        | 36         | 34  | A/mallard/Netherlands/7/2007(H4N2)               |
|                        | 37         | 35  | A/avian/Japan/8KI0148/2008(H4N2)                 |

## Anexo IV. Distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos del segmento 4.

En la diagonal inferior se observa el número absoluto de cambios nucleotídicos entre cada una de las 37 secuencias analizadas del segmento 4, en la diagonal superior se observan las tasas de divergencia nucleotídica de acuerdo al modelo de cambios evolutivos de Kimura dos parámetros. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA versión 5.0.

| América del Norte |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Europa, Asia y Oceanía |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1                 | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30                     | 31   | 32   | 33   | 34   | 35   | 36   | 37   |      |
| 1.                | 0.02 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.16 | 0.17 | 0.18 | 0.18 | 0.17 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.17 | 0.24 | 0.23                   | 0.18 | 0.25 | 0.23 | 0.22 | 0.24 | 0.25 |      |      |
| 2.                | 38   | 0.15 | 0.15 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.15 | 0.16 | 0.16 | 0.17 | 0.16 | 0.15 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.17 | 0.17 | 0.18 | 0.17 | 0.24                   | 0.23 | 0.18 | 0.25 | 0.23 | 0.23 | 0.24 | 0.25 |      |
| 3.                | 223  | 216  | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.05 | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.08 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.08 | 0.09 | 0.09 | 0.22 | 0.20                   | 0.08 | 0.21 | 0.20 | 0.22 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 4.                | 220  | 217  | 66   | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.05 | 0.05 | 0.02 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.04 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.21 | 0.19                   | 0.06 | 0.21 | 0.19 | 0.22 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 5.                | 229  | 222  | 65   | 63   | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.05 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.21 | 0.18                   | 0.07 | 0.21 | 0.19 | 0.20 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 6.                | 229  | 222  | 65   | 63   | 0    | 0.00 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.05 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.21 | 0.18                   | 0.07 | 0.21 | 0.19 | 0.20 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 7.                | 227  | 220  | 65   | 63   | 4    | 4    | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.05 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.21 | 0.18                   | 0.07 | 0.21 | 0.19 | 0.20 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 8.                | 225  | 219  | 77   | 49   | 67   | 67   | 67   | 0.05 | 0.05 | 0.03 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.04 | 0.09 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.22                   | 0.19 | 0.05 | 0.21 | 0.20 | 0.22 | 0.20 | 0.21 |      |
| 9.                | 227  | 227  | 73   | 69   | 65   | 65   | 65   | 79   | 0.01 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.09 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.20 | 0.19                   | 0.07 | 0.21 | 0.20 | 0.21 | 0.21 | 0.21 |      |      |
| 10.               | 224  | 224  | 75   | 73   | 66   | 66   | 66   | 81   | 12   | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.08 | 0.09 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.09 | 0.20 | 0.18                   | 0.08 | 0.21 | 0.20 | 0.21 | 0.21 | 0.21 |      |      |
| 11.               | 221  | 217  | 60   | 37   | 59   | 59   | 59   | 47   | 63   | 69   | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.04 | 0.09 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.22 | 0.19                   | 0.05 | 0.21 | 0.20 | 0.22 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 12.               | 228  | 220  | 106  | 101  | 92   | 92   | 93   | 109  | 74   | 72   | 99   | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.07 | 0.03 | 0.10 | 0.11 | 0.04 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.20 | 0.19                   | 0.10 | 0.21 | 0.20 | 0.21 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 13.               | 231  | 225  | 108  | 100  | 92   | 92   | 91   | 110  | 71   | 69   | 98   | 16   | 0.03 | 0.00 | 0.07 | 0.03 | 0.10 | 0.11 | 0.04 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.20 | 0.19                   | 0.10 | 0.21 | 0.20 | 0.21 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 14.               | 231  | 231  | 113  | 103  | 99   | 99   | 99   | 115  | 90   | 89   | 104  | 49   | 49   | 0.03 | 0.07 | 0.02 | 0.11 | 0.11 | 0.02 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.20 | 0.18                   | 0.10 | 0.21 | 0.19 | 0.21 | 0.20 | 0.21 |      |      |
| 15.               | 231  | 225  | 108  | 100  | 92   | 92   | 91   | 110  | 71   | 69   | 98   | 16   | 0    | 49   | 0.07 | 0.03 | 0.10 | 0.11 | 0.04 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.20 | 0.19                   | 0.10 | 0.21 | 0.20 | 0.21 | 0.21 | 0.21 |      |      |
| 16.               | 221  | 216  | 79   | 57   | 73   | 73   | 73   | 64   | 82   | 86   | 61   | 106  | 105  | 111  | 105  | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.20 | 0.19                   | 0.07 | 0.22 | 0.19 | 0.22 | 0.21 | 0.21 |      |      |
| 17.               | 233  | 231  | 121  | 116  | 112  | 112  | 112  | 126  | 91   | 89   | 112  | 53   | 53   | 29   | 53   | 119  | 0.11 | 0.11 | 0.02 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.19                   | 0.18 | 0.11 | 0.21 | 0.19 | 0.20 | 0.20 | 0.21 |      |
| 18.               | 243  | 239  | 122  | 98   | 117  | 117  | 117  | 107  | 119  | 124  | 82   | 151  | 150  | 154  | 150  | 118  | 157  | 0.01 | 0.11 | 0.04 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.21                   | 0.20 | 0.09 | 0.22 | 0.20 | 0.23 | 0.21 | 0.22 |      |
| 19.               | 246  | 240  | 128  | 106  | 123  | 123  | 123  | 113  | 127  | 132  | 90   | 156  | 155  | 155  | 122  | 162  | 18   | 0.12 | 0.04 | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.21                   | 0.20 | 0.10 | 0.23 | 0.20 | 0.22 | 0.21 | 0.22 |      |
| 20.               | 237  | 235  | 122  | 116  | 110  | 110  | 110  | 124  | 101  | 100  | 114  | 54   | 56   | 26   | 56   | 123  | 29   | 161  | 166  | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.20                   | 0.18 | 0.11 | 0.21 | 0.19 | 0.20 | 0.20 | 0.21 |      |
| 21.               | 245  | 238  | 127  | 107  | 120  | 120  | 120  | 111  | 126  | 129  | 93   | 149  | 148  | 162  | 148  | 122  | 165  | 58   | 62   | 165  | 0.00 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.21                   | 0.20 | 0.10 | 0.23 | 0.20 | 0.22 | 0.22 | 0.23 |      |
| 22.               | 245  | 238  | 127  | 107  | 120  | 120  | 120  | 111  | 126  | 129  | 93   | 149  | 148  | 162  | 148  | 122  | 165  | 58   | 62   | 165  | 2    | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.03                   | 0.21 | 0.20 | 0.10 | 0.23 | 0.20 | 0.22 | 0.22 | 0.23 |
| 23.               | 248  | 244  | 127  | 103  | 120  | 120  | 120  | 112  | 124  | 127  | 87   | 152  | 151  | 153  | 151  | 123  | 156  | 11   | 21   | 160  | 61   | 61   | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.21                   | 0.21 | 0.10 | 0.23 | 0.21 | 0.23 | 0.22 | 0.23 |      |
| 24.               | 246  | 242  | 126  | 106  | 123  | 123  | 123  | 115  | 121  | 126  | 90   | 154  | 153  | 153  | 153  | 126  | 160  | 15   | 25   | 166  | 61   | 61   | 20   | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.21                   | 0.20 | 0.09 | 0.23 | 0.21 | 0.23 | 0.22 | 0.23 |      |
| 25.               | 246  | 243  | 129  | 99   | 116  | 116  | 116  | 106  | 124  | 129  | 85   | 153  | 152  | 155  | 152  | 121  | 158  | 19   | 27   | 164  | 63   | 63   | 22   | 26   | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.21                   | 0.21 | 0.10 | 0.23 | 0.20 | 0.22 | 0.21 | 0.22 |      |
| 26.               | 244  | 240  | 124  | 104  | 121  | 121  | 121  | 113  | 119  | 124  | 88   | 152  | 151  | 157  | 151  | 124  | 158  | 13   | 23   | 164  | 59   | 59   | 18   | 2    | 24   | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.21                   | 0.20 | 0.09 | 0.23 | 0.20 | 0.22 | 0.22 | 0.23 |      |
| 27.               | 246  | 240  | 129  | 101  | 122  | 122  | 122  | 112  | 124  | 129  | 89   | 152  | 151  | 153  | 151  | 123  | 156  | 11   | 21   | 160  | 61   | 61   | 6    | 20   | 22   | 18   | 0.01 | 0.03 | 0.21                   | 0.20 | 0.10 | 0.23 | 0.20 | 0.23 | 0.22 | 0.23 |      |
| 28.               | 248  | 244  | 130  | 106  | 124  | 124  | 124  | 116  | 125  | 130  | 91   | 156  | 155  | 157  | 155  | 126  | 159  | 13   | 23   | 162  | 63   | 63   | 6    | 21   | 24   | 19   | 8    | 0.03 | 0.21                   | 0.21 | 0.10 | 0.23 | 0.21 | 0.23 | 0.22 | 0.23 |      |
| 29.               | 240  | 233  | 126  | 102  | 117  | 117  | 116  | 108  | 123  | 128  | 92   | 152  | 150  | 163  | 150  | 121  | 166  | 36   | 42   | 168  | 52   | 52   | 39   | 41   | 43   | 39   | 39   | 41   | 0.21                   | 0.19 | 0.10 | 0.22 | 0.20 | 0.22 | 0.21 | 0.22 |      |
| 30.               | 319  | 323  | 293  | 287  | 285  | 285  | 283  | 291  | 277  | 273  | 280  | 275  | 275  | 272  | 275  | 265  | 268  | 285  | 288  | 269  | 281  | 283  | 290  | 287  | 284  | 285  | 287  | 291  | 283                    | 0.12 | 0.22 | 0.16 | 0.11 | 0.14 | 0.15 | 0.16 |      |
| 31.               | 304  | 312  | 269  | 260  | 254  | 254  | 253  | 261  | 257  | 255  | 252  | 262  | 260  | 252  | 260  | 265  | 265  | 252  | 275  | 272  | 253  | 271  | 271  | 280  | 277  | 275  | 277  | 278  | 282                    | 266  | 174  | 0.20 | 0.13 | 0.07 | 0.07 | 0.11 | 0.13 |
| 32.               | 253  | 247  | 115  | 97   | 110  | 110  | 110  | 76   | 111  | 113  | 95   | 142  | 143  | 145  | 143  | 108  | 153  | 133  | 143  | 156  | 142  | 142  | 140  | 137  | 135  | 135  | 142  | 144  | 145                    | 297  | 268  | 0.22 | 0.21 | 0.21 | 0.21 | 0.21 | 0.22 |
| 33.               | 329  | 327  | 288  | 287  | 287  | 287  | 285  | 285  | 288  | 289  | 279  | 284  | 286  | 285  | 286  | 292  | 288  | 302  | 304  | 287  | 309  | 309  | 309  | 310  | 305  | 308  | 307  | 311  | 298                    | 218  | 184  | 294  | 0.11 | 0.14 | 0.04 | 0.02 |      |
| 34.               | 310  | 313  | 269  | 265  | 266  | 266  | 264  | 274  | 270  | 269  | 263  | 268  | 269  | 265  | 269  | 267  | 267  | 276  | 275  | 266  | 278  | 278  | 281  | 280  | 276  | 278  | 277  | 283  | 269                    | 159  | 109  | 287  | 165  | 0.10 | 0.11 | 0.11 |      |
| 35.               | 302  | 307  | 294  | 291  | 277  | 277  | 278  | 291  | 286  | 282  | 285  | 282  | 281  | 285  | 281  | 298  | 274  | 303  | 300  | 279  | 297  | 299  | 308  | 303  | 301  | 301  | 306  | 309  | 295                    | 196  | 106  | 290  | 201  | 139  | 0.14 | 0.14 |      |
| 36.               | 323  | 319  | 276  | 279  | 272  | 272  | 270  | 273  | 284  | 281  | 269  | 278  | 283  | 271  | 283  | 284  | 276  | 288  | 286  | 273  | 296  | 296  | 295  | 294  | 287  | 294  | 293  | 297  | 288                    | 207  | 164  | 283  | 65   | 165  | 197  | 0.04 |      |
| 37.               | 333  | 333  | 287  | 286  | 284  | 284  | 282  | 286  | 285  | 284  | 276  | 287  | 287  | 286  | 287  | 289  | 289  | 298  | 299  | 288  | 304  | 304  | 305  | 306  | 301  | 304  | 303  | 307  | 294                    | 219  | 182  | 299  | 27   | 165  | 201  | 68   |      |

### Anexo V. Distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos del segmento 6.

En la diagonal inferior se observa el número absoluto de cambios nucleotídicos entre cada una de las 35 secuencias analizadas del segmento 4, en la diagonal superior se observan las tasas de divergencia nucleotídica de acuerdo al modelo de cambios evolutivos de Kimura dos parámetros. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA versión 5.0.

|     | América del Norte |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Europa, Asia y Oceanía |      |      |      |      |      |      |
|-----|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------|------|------|------|------|------|------|
|     | 1                 | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29                     | 30   | 31   | 32   | 33   | 34   | 35   |
| 1.  |                   | 0.01 | 0.02 | 0.10 | 0.09 | 0.10 | 0.09 | 0.09 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.12 | 0.11 | 0.10 | 0.12 | 0.13 | 0.12 | 0.14 | 0.14 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.14                   | 0.15 | 0.15 | 0.17 | 0.15 | 0.15 | 0.14 |
| 2.  | 20                |      | 0.02 | 0.10 | 0.09 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.13 | 0.11 | 0.10 | 0.12 | 0.13 | 0.12 | 0.14 | 0.14 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.14 | 0.15                   | 0.14 | 0.17 | 0.14 | 0.15 | 0.14 |      |
| 3.  | 28                | 26   |      | 0.09 | 0.08 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.11 | 0.12 | 0.11 | 0.09 | 0.12 | 0.13 | 0.11 | 0.14 | 0.14 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.12 | 0.13                   | 0.14 | 0.14 | 0.16 | 0.14 | 0.14 | 0.13 |
| 4.  | 124               | 126  | 116  |      | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.06 | 0.03 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.10                   | 0.10 | 0.12 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |      |
| 5.  | 116               | 118  | 108  | 18   |      | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.05 | 0.03 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.08                   | 0.10 | 0.10 | 0.12 | 0.10 | 0.09 | 0.09 |
| 6.  | 124               | 126  | 116  | 0    | 18   |      | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.06 | 0.03 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09                   | 0.10 | 0.10 | 0.12 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |
| 7.  | 121               | 123  | 113  | 5    | 17   | 5    |      | 0.00 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.05 | 0.03 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.10                   | 0.10 | 0.12 | 0.11 | 0.09 | 0.10 |      |
| 8.  | 121               | 123  | 113  | 5    | 17   | 5    | 0    |      | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.05 | 0.03 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.10                   | 0.10 | 0.12 | 0.11 | 0.09 | 0.10 |      |
| 9.  | 130               | 132  | 120  | 55   | 51   | 55   | 54   | 54   |      | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.06 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.05 | 0.09 | 0.09 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.09 | 0.10                   | 0.10 | 0.13 | 0.11 | 0.09 | 0.10 |      |
| 10. | 123               | 125  | 113  | 43   | 41   | 43   | 42   | 42   | 45   |      | 0.01 | 0.02 | 0.05 | 0.08 | 0.05 | 0.01 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.09 | 0.09 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.08 | 0.10                   | 0.10 | 0.12 | 0.11 | 0.09 | 0.10 |      |
| 11. | 123               | 125  | 113  | 37   | 37   | 37   | 36   | 36   | 42   | 16   |      | 0.02 | 0.05 | 0.07 | 0.05 | 0.02 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.09 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.10                   | 0.09 | 0.13 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |      |
| 12. | 134               | 134  | 122  | 50   | 50   | 49   | 49   | 54   | 21   | 27   |      | 0.06 | 0.08 | 0.06 | 0.00 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.10 | 0.10                   | 0.13 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |      |      |
| 13. | 142               | 144  | 136  | 73   | 69   | 73   | 72   | 46   | 71   | 67   | 74   |      | 0.07 | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.05 | 0.09 | 0.06 | 0.10 | 0.10 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.10 | 0.11                   | 0.11 | 0.14 | 0.12 | 0.10 | 0.11 |      |
| 14. | 155               | 158  | 150  | 107  | 103  | 107  | 106  | 106  | 84   | 99   | 96   | 108  | 86   |      | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.11 | 0.07 | 0.12 | 0.12 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.09 | 0.07 | 0.11 | 0.13                   | 0.13 | 0.15 | 0.13 | 0.12 | 0.13 |      |
| 15. | 143               | 145  | 137  | 74   | 70   | 74   | 73   | 73   | 46   | 72   | 68   | 75   | 1    | 87   |      | 0.05 | 0.06 | 0.09 | 0.06 | 0.10 | 0.10 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.10                   | 0.11 | 0.11 | 0.14 | 0.12 | 0.10 | 0.12 |
| 16. | 129               | 129  | 117  | 47   | 47   | 47   | 46   | 46   | 50   | 18   | 24   | 5    | 72   | 107  | 73   |      | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.10                   | 0.10 | 0.13 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |      |
| 17. | 155               | 153  | 147  | 94   | 90   | 94   | 93   | 93   | 67   | 88   | 84   | 93   | 73   | 88   | 74   | 90   |      | 0.10 | 0.01 | 0.12 | 0.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.07 | 0.01 | 0.02 | 0.10                   | 0.13 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.12 | 0.13 |
| 18. | 165               | 162  | 159  | 100  | 97   | 100  | 97   | 97   | 101  | 92   | 92   | 102  | 116  | 136  | 117  | 101  | 126  |      | 0.10 | 0.02 | 0.02 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.12                   | 0.09 | 0.09 | 0.13 | 0.10 | 0.08 | 0.09 |
| 19. | 152               | 152  | 144  | 90   | 86   | 90   | 89   | 89   | 63   | 84   | 80   | 89   | 73   | 86   | 74   | 86   | 8    | 124  |      | 0.11 | 0.11 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.01 | 0.02 | 0.10                   | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.12 | 0.12 |      |
| 20. | 179               | 176  | 173  | 119  | 114  | 119  | 118  | 118  | 120  | 115  | 111  | 120  | 132  | 153  | 133  | 119  | 145  | 34   | 143  |      | 0.00 | 0.11 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.13 | 0.12 | 0.12 | 0.02                   | 0.10 | 0.10 | 0.15 | 0.11 | 0.09 | 0.11 |
| 21. | 176               | 173  | 170  | 115  | 110  | 115  | 114  | 114  | 116  | 111  | 107  | 116  | 131  | 149  | 132  | 115  | 141  | 32   | 139  | 4    |      | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.12 | 0.02 | 0.10                   | 0.10 | 0.15 | 0.11 | 0.09 | 0.10 |      |
| 22. | 152               | 152  | 144  | 90   | 86   | 90   | 89   | 89   | 63   | 84   | 80   | 89   | 71   | 84   | 72   | 86   | 10   | 126  | 4    | 143  | 141  |      | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.01 | 0.02 | 0.10                   | 0.12 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.11 | 0.12 |
| 23. | 150               | 150  | 142  | 90   | 86   | 90   | 89   | 89   | 63   | 84   | 80   | 89   | 71   | 86   | 72   | 86   | 12   | 126  | 6    | 145  | 141  | 4    |      | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.01 | 0.02 | 0.10                   | 0.12 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.11 | 0.12 |
| 24. | 152               | 152  | 144  | 90   | 86   | 90   | 89   | 89   | 63   | 84   | 80   | 89   | 70   | 84   | 71   | 86   | 10   | 126  | 4    | 145  | 141  | 2    | 4    |      | 0.00 | 0.07 | 0.01 | 0.02 | 0.10                   | 0.12 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.11 | 0.12 |
| 25. | 150               | 150  | 142  | 90   | 86   | 90   | 89   | 89   | 63   | 84   | 80   | 89   | 71   | 86   | 72   | 86   | 12   | 126  | 6    | 145  | 141  | 4    | 0    | 4    |      | 0.07 | 0.01 | 0.02 | 0.10                   | 0.12 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.11 | 0.12 |
| 26. | 150               | 153  | 140  | 87   | 87   | 87   | 86   | 86   | 68   | 91   | 87   | 98   | 74   | 110  | 75   | 94   | 95   | 139  | 93   | 156  | 152  | 91   | 89   | 91   | 89   |      | 0.07 | 0.07 | 0.12                   | 0.12 | 0.13 | 0.15 | 0.13 | 0.12 | 0.13 |
| 27. | 156               | 156  | 148  | 96   | 92   | 96   | 95   | 95   | 69   | 90   | 86   | 95   | 75   | 90   | 76   | 92   | 16   | 132  | 12   | 151  | 147  | 10   | 12   | 10   | 12   | 91   |      | 0.02 | 0.11                   | 0.12 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.12 | 0.13 |
| 28. | 156               | 156  | 148  | 96   | 94   | 96   | 95   | 95   | 69   | 86   | 86   | 95   | 71   | 87   | 72   | 92   | 30   | 132  | 26   | 151  | 147  | 26   | 28   | 26   | 28   | 91   | 34   |      | 0.11                   | 0.12 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.11 | 0.12 |
| 29. | 172               | 169  | 166  | 111  | 110  | 110  | 110  | 105  | 103  | 107  | 124  | 143  | 125  | 108  | 133  | 23   | 131  | 30   | 28   | 133  | 133  | 133  | 133  | 133  | 148  | 137  | 139  |      | 0.10                   | 0.10 | 0.13 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |      |
| 30. | 182               | 182  | 177  | 127  | 126  | 127  | 126  | 126  | 128  | 122  | 124  | 130  | 138  | 160  | 139  | 129  | 156  | 115  | 148  | 130  | 128  | 148  | 148  | 148  | 148  | 152  | 150  | 148  | 122                    |      | 0.11 | 0.15 | 0.11 | 0.10 | 0.11 |
| 31. | 180               | 177  | 173  | 125  | 125  | 125  | 126  | 126  | 128  | 123  | 121  | 125  | 143  | 162  | 144  | 124  | 155  | 117  | 151  | 132  | 130  | 149  | 149  | 149  | 149  | 158  | 155  | 151  | 126                    | 141  |      | 0.14 | 0.03 | 0.07 | 0.03 |
| 32. | 206               | 209  | 201  | 154  | 154  | 154  | 155  | 155  | 164  | 155  | 158  | 163  | 171  | 187  | 172  | 162  | 185  | 161  | 181  | 181  | 181  | 181  | 181  | 181  | 181  | 186  | 183  | 187  | 165                    | 186  | 176  |      | 0.15 | 0.14 | 0.14 |
| 33. | 181               | 177  | 173  | 133  | 131  | 133  | 134  | 134  | 138  | 135  | 131  | 133  | 151  | 162  | 152  | 132  | 164  | 124  | 160  | 137  | 135  | 158  | 158  | 158  | 158  | 162  | 164  | 160  | 131                    | 144  | 40   | 180  |      | 0.07 | 0.01 |
| 34. | 182               | 180  | 174  | 112  | 113  | 112  | 115  | 115  | 121  | 116  | 113  | 121  | 131  | 151  | 132  | 120  | 148  | 108  | 146  | 119  | 117  | 144  | 144  | 144  | 144  | 148  | 150  | 145  | 113                    | 128  | 89   | 169  | 97   |      | 0.07 |
| 35. | 175               | 171  | 167  | 125  | 121  | 125  | 126  | 126  | 130  | 127  | 123  | 127  | 145  | 162  | 146  | 126  | 156  | 122  | 152  | 135  | 133  | 150  | 150  | 150  | 150  | 158  | 156  | 152  | 129                    | 142  | 36   | 178  | 14   | 93   |      |