



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud

Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN CUATRO GENES INTERNOS
(PB2, PA, NP Y M) DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA AISLADOS EN
MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

P R E S E N T A

MVZ. VICTOR MANUEL CARRERA AGUIRRE

TUTOR

DR. José Iván Sánchez Betancourt (FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL

MC. María del Carmen Mercado García (FMVZ-UNAM)

DRA. Susana Elisa Mendoza Elvira (FES-Cuautitlán-UNAM)

México, D.F. Abril 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A **Dios...** “Te veo”.

Para mi amada familia: mis padres: **María de Jesús y Heriberto**; mis hermanos:

Viridiana y Heriberto.

A la hermosa bebé **Sofía Alejandra L. C**, mi sobrina.

Para **Nancy Hernández**, la mujer que me ha acompañado siempre.

A mi abuela, mis raíces, mi “*machá*”, **Esperanza Contreras.**

AGRADECIMIENTOS

Para mis amigos que me acompañaron en este proceso, lleno de buenas anécdotas y reencuentros. Agradezco infinitamente su amistad: **Raquel V, Ana Gaby L, Miguel Ángel G, José Luis V, Gerardo J, Ismael J, Gabriela S, Gabriela A, Tania J, Sarahi L y Miguel Ángel B.** A los integrantes de la “Banda Marrana” con los que morí de risa: **Pamela A, Obed B, Jessica A, Eva M, Adrián R y Ángel J.**

Gracias por sus experiencias y sobre todo su gran amistad: **Rolando Beltrán, Brenda Sáenz, Mireya Juárez y Alejandro Villegas.**

Agradezco sus palabras de apoyo pero, principalmente su amistad y compañía. Personal Académico del DMZC: **MC. Carmen Mercado, MPA, Alejandra Mercadillo, MC. Rosalba Carreón, MC. Esperanza Galván, MVZ. Esp. Jorge López, MVZ. Esp. Mario Haro, PhD. Pedro Pradal, MPA Marco Herradora y MC. Gerardo Ramírez.** Gracias **Dr. López** por permitirme trabajar a su lado. Personal Administrativo del DMZC: **Sra. Carmen Díaz, Sra. Rosa María Yáñez y al Sr. Inocente Lara,** por su genuina amistad a través de los años.

A mi Comité Tutorial: **Dr. José Iván Sánchez Betancourt, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira y MC. María del Carmen Mercado García.** Una guía fundamental en este proceso. Gracias por confiar en mí.

Agradezco las aportaciones a este trabajo por parte del jurado integrado por: **Dr. Antonio Morilla R., Dr. Humberto Ramírez M., Dra. Clara Espitia P., MC. Rosalba Carreón N. y Dr. José Iván Sánchez B.**

A la **FMVZ-UNAM**, mi *alma mater*.

El presente trabajo fue parcialmente financiado por el **Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF)** No. PICSA 11-19.

El alumno fue becario del Sistema Nacional de Becas de Posgrado del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** con número 424151.

RESÚMEN

CARRERA AGUIRRE VICTOR MANUEL. *“Identificación de mutaciones en cuatro genes internos (PB2, PA, NP y M) del virus de Influenza Porcina aislados en México”* (Bajo la dirección del Dr. José Iván Sánchez Betancourt, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira y la MC. Ma. Del Carmen Mercado García).

El propósito de este estudio, pretende evidenciar la divergencia evolutiva y los cambios genéticos en los genes internos PB2, PA, NP y M de los virus de influenza porcina que circularon en México durante el 2010 con relación a los virus pandémicos A/México/InDRE4487/2009(H1N1), A/México/LaGloria-3/2009 (H1N1) y A/México City/005/2009(H1N1) además, del virus de referencia A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2). Una vez obtenidas las secuencias consenso, se caracterizó la historia evolutiva de los árboles filogenéticos, aplicando el método estadístico de Máxima Verosimilitud con un análisis JModelTest y un test filogenético bootstrap de 1000 repeticiones. Los sitios polimórficos: transiciones y transversiones, InDel (inserciones-delesiones) así como las substituciones sinónimas y no sinónimas fueron computarizados. Los resultados demostraron que la filogenia para los genes PB2, NP y M se mantienen dentro de la misma especie porcina reportado en aislados virales de otros países, sin embargo el gen PA del virus A/swine/México/Qro35/2010(H1N1) está estrechamente relacionado con un virus humano subtipo H3N2, al poseer la mutación característica T552S. Se identificaron 164 mutaciones totales en los siete virus aislados de las cuales 129 son sinónimas y 35 son no sinónimas. No se registraron InDels. Las constantes variaciones genéticas pone en evidencia la evolución de estos virus no solo a nivel de antígenos de superficie si no también en genes internos. Estas mutaciones demuestran la evolución paralela junto a los genes de la Hemoaglutinina y Neuraminidasa, y requieren fuertemente atención en el uso del antígeno adecuado para el diagnóstico de laboratorio.

ABSTRACT

CARRERA AGUIRRE VICTOR MANUEL. *“Identification of mutations in four internal genes (PB2, PA, NP and M) of swine influenza viruses isolated in Mexico”* (Directed by Dr. José Iván Sánchez Betancourt, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira and MC. Ma. Del Carmen Mercado García).

The aim of this study was to show the evolutionary divergence and genetic changes of the internal genes PB2, PA, NP and M of the swine influenza virus circulating in Mexico during 2010 with relation to the pandemic virus A/México/InDRE4487 / 2009 (H1N1), A/México/LaGloria-3/2009 (H1N1) and A / Mexico City/005/2009 (H1N1) as well, the reference virus A/swine/Minnesota/9088-2/98 virus (H3N2). Once the consensus sequences were obtained, the evolutionary history of the phylogenetic trees was defined using the statistical method of Maximum Likelihood with a JModel-Test analysis along with a phylogenetic bootstrap test with 1000 replicates. Polymorphic sites such as transitions and transversions, InDel (insertions-deletions) and synonymous and nonsynonymous substitutions were computerized. Phylogenies for the PB2, NP and M genes shown they are conserved within the same swine viral isolates reported in other countries. However, the PA gene from the A/swine/México/Qro35/2010(H1N1) virus is closely related to a human virus belonging to the H3N2 subtype, harboring the characteristic mutation T552S. A total of 164 mutations were identified within the seven virus isolates from which 129 are synonymous and 35 are not synonymous. No InDels were recorded. The constant genetic variations demonstrate the evolution of these viruses not only in terms of surface antigens but also in internal genes. These mutations show the parallel evolution along with the hemagglutinin and neuraminidase genes, and special attention is required in the use of the suitable antigen for the laboratory diagnosis.

TEMA	PÁG.
RELACIÓN DE CUADROS E IMÁGENES	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 DEFINICIÓN DE LA INFLUENZA PORCINA.	5
1.2 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS INFLUENZA VIRUS	7
1.2.1 Clasificación taxonómica.	7
1.2.2 Morfología y sensibilidad por agentes físico-químicos.	7
1.2.3 Caracterización Antigénica.	8
1.2.4 Caracterización genética molecular.	9
1.2.5 Deriva antigénica “drift” y variación genética o reordenamiento “shift”.	10
1.2.6 Organización genómica del Virus de Influenza	12
1.2.7 Ciclo de replicación viral (patogénesis por el virus Influenza).	14
1.2.8 Características moleculares de la replicación.	17
1.3 PRUEBAS DE DIAGNOSTICO.	18
1.3.1 Diagnostico Molecular	20
1.4 EPIDEMIOLOGIA.	21
1.4.1 Antecedentes sobre la presencia de virus recombinantes de influenza porcina.	22
1.5 EVOLUCIÓN GENÉTICA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA	25
1.6 GENÓMICA Y BIOINFORMÁTICA APLICADAS AL VIRUS DE INFLUENZA.	28
1.7 REPORTES VIRALES EN CERDOS Y EL VIRUS A/H1N1 EN MÉXICO.	29
2. JUSTIFICACIÓN.	33
3. HIPÓTESIS.	33
4. OBJETIVOS.	33
5. METODOLOGÍA.	34
5.1 SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS VIRALES.	34
5.2 REPLICACIÓN VIRAL.	35
5.3 TITULACIÓN VIRAL.	35
5.4 EXTRACCIÓN DE RNA.	36
5.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.	38
5.6 TÉCNICA DE RT-PCR.	39
5.6.1 RT-PCR para la identificación de segmentos génicos.	39
5.6.2 RT-PCR Multisegmentos (M-RTPCR).	41
5.6.3 Preparación de geles de agarosa y Electroforesis.	42
5.7 SECUENCIACIÓN.	43
5.8 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.	43
6. RESULTADOS	47
6.1 AMPLIFICACIÓN DE LA RT-PCR	47
6.2 AMPLIFICACIÓN DE LA M-RTPCR	49
6.3 SECUENCIACIÓN	51

ÍNDICE

6.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	52
6.4.1 Caracterización Filogenética de los genes internos PB2, PA, NP y M.	52
6.4.1.1 Caracterización filogenética del Gen NP.	53
6.4.1.2 Caracterización filogenética del Gen PB2.	55
6.4.1.3 Caracterización filogenética del Gen PA.	57
6.4.1.4 Caracterización filogenética del Gen M.	60
6.4.2 Frecuencia mutagénica de los aislados virales respecto al virus de referencia H3N2.	64
7. DISCUSIÓN	68
8. CONCLUSIONES	77
9. TENDENCIAS	78
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RELACIÓN DE IMÁGENES Y CUADROS

IMAGEN	PÁG.
Imagen 1. Representación esquemática de un reordenamiento genético entre un virus de influenza aviar y humano, llevado a cabo en un cerdo.	12
Imagen 2. Diagrama esquemático del ciclo de replicación del virus de influenza.	16
Imagen 3. Elementos conservados en las terminaciones 3' y 5' de los virus de influenza.	18
Imagen 4. Diagrama esquemático que muestra la historia de los reordenamientos de las cepas de pandémicas de influenza.	32
Imagen 5. Condiciones óptimas establecidas para la RT-PCR	47
Imagen 6. Producto de amplificación de la RT-PCR para los genes PA y PB2 de los virus de referencia y los aislados virales de interés. Gel de agarosa al 3%.	48
Imagen 7. Producto de amplificación de la RT-PCR para los genes M y NP de los virus de referencia y los aislados virales de interés.	49
Imagen 8. Productos de amplificación para los controles de referencia con la M-RT-PCR para la identificación del genoma completo.	50
Imagen 9. Productos de amplificación para los aislamientos virales con la M-RT-PCR para la identificación del genoma completo.	51
Imagen 10. Análisis filogenético por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de substitución HKY + G para el gen NP	54
Imagen 11. Análisis filogenético por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de substitución HKY + G para el gen PB2	56
Imagen 12. Análisis filogenético por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de substitución GTR + G para el gen PA	59
Imagen 13. Análisis filogenético por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de substitución K2 + G para el gen M	61

ÍNDICE

CUADRO	PÁG.
Cuadro 1. Función y peso molecular de los segmentos genómicos del Virus de Influenza	13
Cuadro 2. Tasa de evolución de nucleótidos del virus de influenza, basados en análisis filogenéticos	26
Cuadro 3. Caracterización genotípica de lo aislados virales	34
Cuadro 4. Secuencia de oligonucleótidos para la RT-PCR Multisegmentos	38
Cuadro 5. Secuencia de oligonucleótidos para la RT-PCR genes PB2, PA, NP y M.	39
Cuadro 6. Volumen final de la reacción de RT-PCR	40
Cuadro 7. Volumen final de la reacción de RT-PCR Multisegmentos	41
Cuadro 8. Caracterización genotípica de los virus pandémicos de influenza A/H1N1	44
Cuadro 9. Modelos de evolución para inferencia filogenética por JModelTest.	45
Cuadro 10. Numero de Acceso GenBank – NCBI para los genes internos.	52
Cuadro 11. Comparación de residuos de aminoácidos para los genes PB2, PA, NP y M en los siete asilamientos virales, confrontados con secuencias virales pandémicas y otras secuencias disponibles en el Genbank.	63
Cuadro 12. Relación porcentual de similitud de las secuencias virales a partir del virus de referencia H3N2 (A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2)).	64
Cuadro 13. Patrón de relación Ti/Tr bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por Máxima Verosimilitud.	65
Cuadro 14. Probabilidad estimada de Ti o Tr para el gen PB2 bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por Máxima Verosimilitud.	65
Cuadro 15. Probabilidad estimada de Ti o Tr para el gen PA bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por Máxima Verosimilitud.	65
Cuadro 16. Probabilidad estimada de Ti o Tr para el gen NP bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por Máxima Verosimilitud.	66
Cuadro 17. Probabilidad estimada de Ti o Tr para el gen M bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por Máxima Verosimilitud.	66
Cuadro 18. Comparación de residuos de aminoácidos para los genes PB2, PA, NP y M en los siete asilamientos virales, tomando como referencia al virus H3N2 (A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2)).	67
Cuadro 19. Numero de mutaciones sinónimas y no sinónimas para los genes PB2, PA, NP y M en los siete asilamientos virales, tomando como referencia al virus H3N2 (A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2)).	67

1. INTRODUCCIÓN

A partir de 1947, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la Red Global de Vigilancia de la Influenza (FLUNET), la cual comprende a 116 Centros Nacionales de Influenza con laboratorios en 87 países y cuatro centros de referencia colaboradores de la OMS; sus actividades pueden ser conocidas en Internet (<http://gamapserver.who.int/GlobalAtlas/home.asp>). Sus objetivos principales son: El seguimiento de virus de la influenza en circulación; presentar las recomendaciones anuales en la composición de la vacuna de la influenza para los hemisferios norte y sur; detectar a virus inusuales en poblaciones humanas que puedan tener un potencial pandémico; proporcionar en colaboración con Laboratorios Nacionales de Referencia las cepas prototipo para vacunas y reactivos de laboratorio estandarizados. En la región del Continente Americano hay 25 Centros Nacionales de la Influenza comunicados con los Centros Colaboradores de la OMS de referencia e investigación de la influenza, como los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta en los Estados Unidos y cuentan con la tecnología más avanzada para secuenciar el contenido genómico del virus [WHO].

1.1 DEFINICIÓN DE LA INFLUENZA PORCINA.

La Influenza Porcina es una enfermedad respiratoria aguda e infecciosa del cerdo, causada por el virus de influenza tipo A de la familia Orthomyxoviridae este virus es un agente primario del Complejo Respiratorio Porcino (CRP) donde participan varios agentes infecciosos de origen bacteriano como: *Salmonella sp*, *Mycoplasma hyopneumoniae*,

Actinobacillus pleuropneumoniae, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* o agentes virales como el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), Parvovirus porcino y Circovirus Porcino tipo 2 (PCV-2). Estos actúan como agentes infecciosos coinfectantes que pueden provocar un impacto clínico-productivo aun mayor en los cerdos [Gramer 2009; Straw *et al.*, 2006; Ducatez *et al.*, 2008; Gramer 2006; Dee 1996].

La influenza en la especie porcina, ocurre comúnmente como una epizootia de neumonía altamente transmisible caracterizada por tos seca, fiebre, disnea y anorexia, los más susceptibles son los cerdos en crecimiento y en finalización debido a la caída de los anticuerpos maternos [Pérez *et al.*, 2007; Vincent 1996]. La industria porcina actual permite la fácil transmisión viral de cerdo a cerdo [Trujano y Palacios 2005] y en las cerdas los estados febriles llegan a provocar abortos en hembras gestantes; [García *et al.*, 2007] su recuperación se produce después de 7-10 días post-infección pero el impacto en la condición corporal es muy importante [Pérez *et al.*, 2007; Trujano y Palacios 2005; Franck 1992]. La influenza porcina se caracteriza por tener una alta morbilidad y baja mortalidad [Vincent 1996; Jiménez *et al.*, 2006] y las lesiones generalmente se desarrollan con rapidez en el aparato respiratorio, en algunos casos puede provocar la muerte, por lo tanto, es probable que el curso, naturaleza y magnitud de la enfermedad varíen con la cepa del virus, la edad y estado inmune del cerdo [Straw *et al.*, 2006].

1.2 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS INFLUENZA VIRUS

1.2.1 Clasificación taxonómica.

Los virus de influenza A, B y C representan tres de los cinco géneros de la familia *Orthomyxoviridae*, que por microscopia electrónica son indistinguibles pero que estructuralmente son variables. La especificidad de los tipos se determina por la naturaleza antigénica de la nucleoproteína (NP) y de la proteína matriz (M) que se encuentran estrechamente relacionados entre todos los tipos de virus de influenza A. Los tipos B y C se encuentran típicamente sólo en humanos. Los virus de influenza tipo A se hallan en seres humanos, cerdos, caballos, ocasionalmente en otros mamíferos como el visón, focas, ballenas y muchas especies aviares. Así, el virus de la influenza que afecta a la especie porcina pertenece al tipo A [Gramer 2005; Bouvier y Palese 2008].

1.2.2 Morfología y sensibilidad por agentes físico-químicos.

Son viriones pleomórficos de tamaño mediano, aproximadamente de 80 a 120nm diámetro, algunas veces pueden adoptar formas filamentosas y medir hasta 400nm. Poseen una envoltura lipídica que se deriva de la membrana plasmática de la célula infectada. Esta envoltura emite proyecciones en forma de espícula y hongo de 10-12nm de longitud. Dentro de la envoltura viral está incluida la nucleoproteína (NP) la cual tiene simetría helicoidal. La composición global aproximada de las partículas virales es 0.8-1% de RNA, 5-8% de carbohidratos, 20-24% de lípidos y cerca del 70-75% de proteínas [Talledo y Zamueta 2009].

Los virus influenza son sensibles al calor (56°C, 30min), al tratamiento con ácidos (pH 3 aprox.) y al tratamiento con solventes lipídicos (hipoclorito de sodio 1-2%, etanol al 60-95%, cuaternarios de amonio 4%, formaldehído 5-8%, glutaraldehído 2%, ácido cítrico 2%, hidróxido de sodio 2%, iodo 2% y fenol 5%) y por tanto son muy lábiles en las condiciones ambientales habituales [Gramer 2009; Straw *et al.*, 2006; Ducatez 2008; Webster *et al.*, 1992].

1.2.3 Caracterización Antigénica.

Los virus de influenza son caracterizados antigénicamente por glicoproteínas (hemoaglutinina (HA) y la neuraminidasa (N)) que se proyectan a la superficie a través de su envoltura en una relación 5:1. Estas glicoproteínas poseen distintas propiedades antigénicas y secuencias nucleotídicas que permiten clasificarlas dentro de 17 hemoaglutininas [Tong *et al.*, 2013] y 9 neuraminidasas, por lo tanto la gama de combinaciones para crear subtipos virales provee la diversidad antigénica de estos virus [Gramer 2005]. Mientras que muchos subtipos genéticamente distintos han sido encontrados en circulación en varias especies como humanos, mamíferos y aves en los virus de influenza tipo A, solo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos NA (N1 y N2) han causado epidemias en humanos [Bouvier y Palese 2008]. Los cerdos se pueden infectar con cepas de influenza humana y aviares pues su tracto respiratorio tiene receptores para estos 2 virus [Gramer 2009; Brown 2000; Thacker y Janke 2008; Naffakh y Van der Werf 2009; Morilla 2009]. La unión entre el Acido Sialico (AS) con los azúcares, determinan dos tipos de cadenas: AS- α 2-3-Gal- β -1-3-N-

acetil-glucosamina (AS- α 2,3-Gal receptor del virus de influenza en aves y caballos) y AS- α 2-6-Gal- β -1-4-N-acetilglucosamina (AS- α 2,6-Gal receptor del virus de influenza en humanos), que se encuentran distribuidas de manera diferente en las especies animales [Naffakh y Van der Werf 2009; Morilla 2009].

El sistema actual de nomenclatura del virus de influenza, [Bulletin of the WHO, 1980], designa tipo, huésped, origen geográfico, número de cepa, año de aislamiento y subtipo antigénico (ejemplo: A/Cerdo/Wis/1/84(H1N1)) [Gramer 2009; Straw *et al.*, 2006; Gramer 2005; Morilla *et al.*, 2004].

1.2.4 Caracterización genética molecular.

La HA está constituida por 3 polipéptidos y cada polipéptido es integrado en dos subunidades HA1 y HA2. Por la extremidad hidrófoba la HA2 se une a la capa lipídica de la envoltura y por su extremidad hidrófila la HA1 se fija a los receptores mucoproteínicos de los glóbulos rojos y de las células del epitelio respiratorio. Las HA son responsables de la hemaglutinación y de la fijación del virus a las células, primer paso para su penetración y replicación. La NA está compuesta por una cabeza y un filamento, la cabeza está constituida por la asociación de cuatro glicopéptidos, que presentan actividad fermentativa, pues al actuar sobre el AS-N-acetilneuramínico, principal componente de los receptores celulares, los destruye produciendo un fenómeno de elusión o separación del virus de los glóbulos rojos y células infectadas.

En la envoltura viral existe un pequeño número de canales iónicos que regulan el pH intracelular creado por una proteína integral tetramérica unida

por puentes disulfuro, conocida como proteína matriz 2 (M2). La relación entre canales de M2 y HA es 1:10². Las mutaciones que ocurren en el gen que codifica esta proteína determinan la resistencia a los fármacos antivirales [Bouvier y Palese 2008; García y Ramos 2006]. Debajo de la envoltura viral, se encuentra la proteína interna de matriz 1 (M1), que engloba al núcleo del virión, además de encontrarse la proteína de exportación nuclear (NEP o NS2) y el complejo ribonucleoprotéico (RNP), que consiste en segmentos de RNA cubiertos con NP y el complejo heterotrimérico de polimerasas dependientes de RNA compuestas de dos polimerasas básicas y una proteína ácida: subunidades PB1, PB2 y PA respectivamente, que constituyen el origen de la replicación y transcripción de RNA. Numerosos estudios han indicado que el correcto ensamblaje y ordenamiento del complejo heterotrimérico de subunidades de polimerasa es crucial para la transcripción y replicación del virus de influenza en el núcleo de células infectadas [Bouvier y Palese 2008; Asawin *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2004; Amorim y Digard 2006].

La especificidad entre los tres tipos A, B y C, se determina con base a la codificación proteica de los segmentos génicos 5 y 7 que son la nucleoproteína (NP) y proteína matriz 1 (M).

1.2.5 Deriva antigénica “drift” y variación genética o reordenamiento “shift”.

Las características del virus de influenza A que contribuyen a la variación de su genoma incluyen: la actividad de la RNA polimerasa debido a que es proclive al error y las mutaciones se acumulan y la segunda es la

versatilidad del virus al infectar una amplia variedad de animales, lo que permite el intercambio de información genética entre diferentes virus [Manjarrez *et al.*, 2012].

Los cambios a nivel molecular son producidos así, por la *variación antigénica* o “*drift*” y la *variación genética* o “*shift*”. La *variación antigénica* o “*drift*”, se da por mutaciones puntuales e individuales en la sustitución de aminoácidos de las glicoproteínas de la envoltura viral HA y NA, modificando su composición amínica e identidad antigénica. Este tipo de fenómeno es muy importante para la patogénesis del virus y no sólo se restringe a modificaciones de la HA y NA, ya que en algunos casos la deriva antigénica ha llevado a modificaciones en la NP provocando que los virus consigan escapar al reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos. En la práctica, una variante por deriva antigénica que cause enfermedad significativa aparece en promedio cada 4 años y tiene cinco o más sustituciones de aminoácidos en dos o más sitios antigénicos.

La *variación genética* o “*shift*”, ocurre cuando un animal sufre una doble infección por más de un subtipo diferente y los segmentos geonómicos virales se reasocian y desarrolla una nueva combinación en las proteínas en una sola partícula viral. Estos cambios por lo general se presenta en períodos largos de 10 a 40 años y han sido los causantes de la aparición de los diferentes subtipos virales pandémicos a lo largo de la historia conocida de los virus de influenza [Gramer 2009; Talledo y Zamueta 2009; Brown 2009; Arbelaez *et al.*, 2008; Geo y Westover 2008]. Ver imagen 1

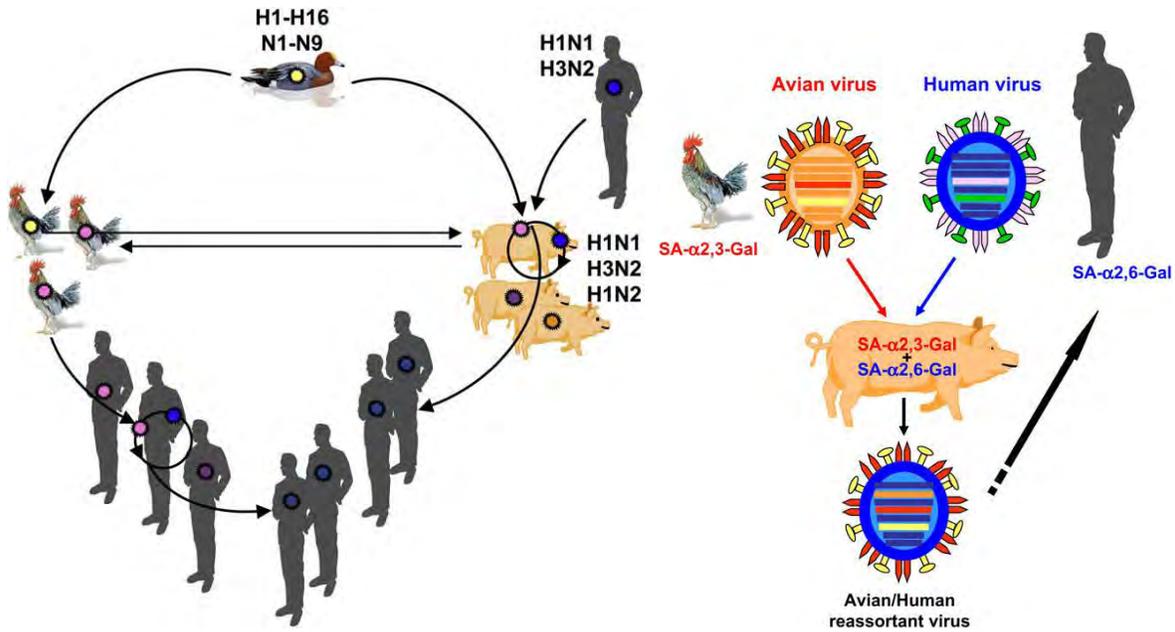


Imagen 1. Representación esquemática de un reordenamiento genético entre un virus de influenza aviar y humano, llevado a cabo en un cerdo. [Naffakh y Van der Werf 2009]

1.2.6 Organización genómica del Virus de Influenza

Estos virus son caracterizados por su genoma RNA de cadena simple y polaridad negativa con una longitud aproximada de 13.5kb segmentada en 8 cadenas. Los ocho segmentos del virus de influenza A y B (siete segmentos de influenza tipo C) son numerados de acuerdo a su longitud. Los segmentos 1, 3, 4, 5 y 6 codifican solo para una proteína por segmento: la PB2, PA, HA, NP y NA. Todos los virus de influenza sintetizan la subunidad PB1 de la polimerasa en el segmento dos y en algunas cepas estos segmentos, además codifican la proteína accesoria PB1-F2, una proteína de 87aa con actividad proapoptótica. Los virus B y C no producen una proteína análoga PB1-F2 [Chen *et al.*, 2001]. El segmento seis de los virus tipo A, codifican solo para la NA, mientras que el tipo B codifica ambos la proteína NA y una proteína matriz NB integral de membrana que

INTRODUCCIÓN

corresponde a la proteína M2 del virus de influenza tipo A [Hatta y Kawaoka 2003]. El segmento siete para los virus tipo A codifica para la proteína matriz M1 y M2, mientras que en los virus tipo B de este mismo segmento codifican para M1 y una proteína de membrana BM2 [Lamb *et al.*, 1981; Briedis *et al.*, 1982]. Finalmente, ambos virus tanto el tipo A como el B, el segmento ocho expresa la proteína NS1 antagonista del interferón [Dauber *et al.*, 2004; Kochs *et al.*, 2007] y la NEP/NS2 que está involucrada en la exportación de la RNP viral de los núcleos de las células huésped [Briedis y Lamb 1982]. La organización del genoma de los virus de influenza tipo C es similar a los otros virus, sin embargo la proteína HEF de influenza C reemplaza a la HA y NA y por lo tanto su genoma tiene menos segmentos que los virus tipo A y B [Bouvier y Palese 2008].

Las ocho cadenas de RNA del virus de influenza tipo A, codifican para 11 proteínas: 7 estructurales y 3 no estructurales [Gramer 2009; Zhou *et al.*, 2009]. Ver cuadro 1.

Cuadro 1. *Función y peso molecular de los segmentos genómicos del Virus de Influenza A. [Gramer 2009]*

Segmento	Longitud Kb	Longitud aa	Proteína
1	2,341 pb (2.3kb)	759	PB2
2	2,341 pb (2.3kb)	757	PB1
		87	PB1 – F2
3	2,233 pb (2.2kb)	716	PA
4	1,778 pb (1.8kb)	550	HA
5	1,565 pb (1.6kb)	498	NP
6	1,413 pb (1.4kb)	454	NA
7	1,027 pb (1.0kb)	252	M1
		97	M2
8	890 pb (0.9kb)	230	NS1
		121	NEP/NS2

1.2.7 Ciclo de replicación viral (patogénesis por el virus Influenza).

El ciclo de replicación del virus Influenza se inicia con la unión del virus a los receptores de AS de la superficie celular a través de las glicoproteínas de superficie HA. Este paso es determinante para la patogénesis, transmisión y estrechez del rango de hospedero [Salomón y Webster 2009].

El virus al entrar al organismo, llega a la mucosa del aparato respiratorio superior para posteriormente penetrar la célula por medio de receptores presentes en la membrana celular en la especie porcina: AS- α 2,3-Gal (lamina propia del tracto respiratorio) y AS- α 2,6-Gal (tráquea y epitelio bronquial). Dichos receptores son una llave determinante en la restricción de la transmisión del virus de influenza directamente de las aves a los seres humanos [Rogers y Paulson 1983; Nelli *et al.*, 2010].

Cada segmento del genoma viral debe ser transcrito en RNAm, lo que da oportunidad para el control transcripcional de la expresión génica. La mayoría de virus con genomas segmentados y de sentido negativo se replican en el citoplasma (traen sus propias enzimas para la transcripción), sin embargo el virus de Influenza se replica en el núcleo celular y utiliza la RNA polimerasa II, dependiente de DNA celular y funcional, aunque esta enzima no transcriba su genoma [Dimmock *et al.*, 2001].

Después de que las hemoaglutininas se unen con alto grado de especificidad a los receptores de la membrana celular, comienza el proceso de endocitosis llevado a cabo en los endosomas que se caracterizan por tener un pH cercano a 5.0 que estimula los canales de iones activos del virus asociados a la proteína M2 para permitir el flujo de iones del

endosoma hacia el interior del virus, desestabilizando la unión proteína-proteína y así, liberar al citoplasma las ribonucleoproteínas (RNPs) de la proteína matriz M1. Las RNPs virales liberadas son transportadas al núcleo a través de los poros nucleares para iniciar la transcripción del RNAm.

Para iniciar la transcripción el virus de influenza requiere la participación de una RNA polimerasa II (endonucleasa) celular para la regeneración de RNAm con cap y un sitio de metilación. La PB2 reconocerá y se unirá al cap metilado del extremo 5' de los RNAm celulares y los cortará en 10-15 nucleótidos, estos fragmentos serán utilizados por la PB1 que catalizará la adición de nucleótidos durante la elongación del RNAm correspondiente a cada segmento del genoma viral. Se obtienen así dos tipos de RNA de polaridad positiva: los RNAm que darán origen a las proteínas virales y los RNA complementarios que serán utilizados para elaborar más copias de RNA viral en sentido negativo [Resa *et al.*, 2011; Manjareez *et al.*, 2010].

La síntesis de proteínas virales externas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso y progresan en el aparato de Golgi, para después ser expulsadas en una sola vesícula hacia la superficie de la célula infectada. En el núcleo el genoma viral negativo produce copias de su mismo genoma positivo, con la finalidad de replicar su gen (RNA). Después se une a NPs y a la proteína M1, para formar segmentos individuales que darán origen a la nucleocápside. A partir de este momento la partícula viral puede tomar forma y brotar a través de la membrana celular que ya ha sido cubierta por glicoproteínas HA y NA y adquirirlas para poder infectar otras células [Straw *et al.*, 2006; Pensae 1989]. Ver imagen 2.

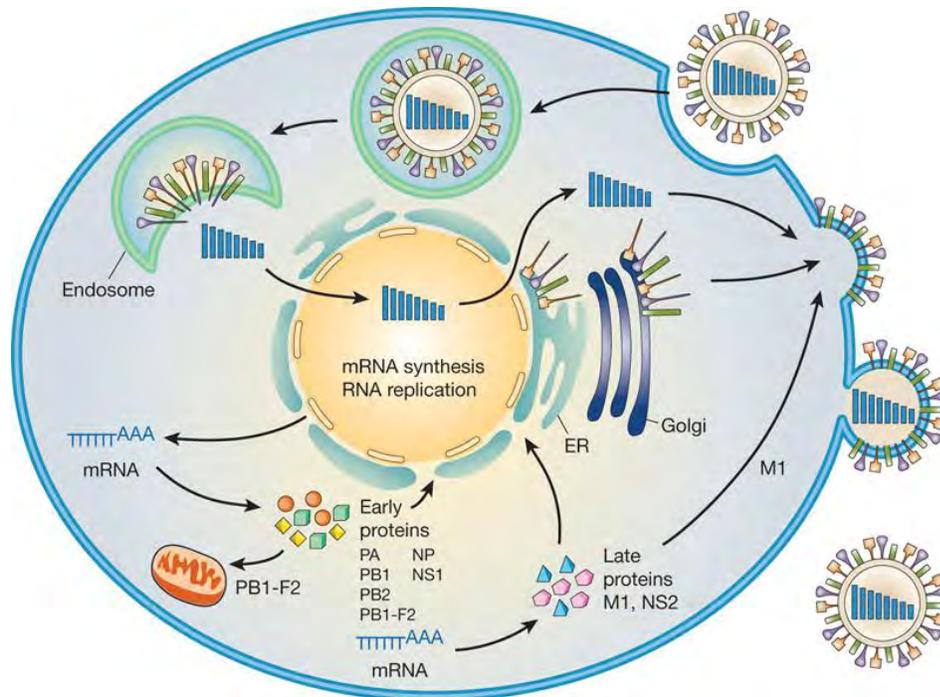


Imagen 2. Diagrama esquemático del ciclo de replicación del virus de influenza. [Neumann *et al.*, 2009]

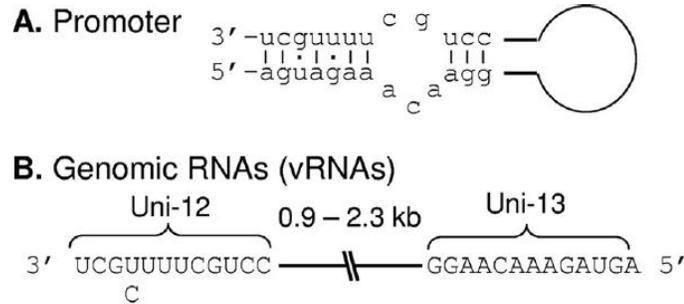
El proceso de replicación viral dispara los factores de transducción de señales que inducen a la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral Alfa ($\text{TNF-}\alpha$), iniciando la comúnmente llamada “tormenta de citoquinas”, y que se piensa que juega un rol prominente en la morbilidad y mortalidad de este virus [Cheung *et al.*, 2002; De Jong *et al.*, 2006; Kash *et al.*, 2006]. La síntesis de proteínas no estructurales del virus activa a la producción de Interferón alfa y beta ($\text{IFN}\alpha / \beta$) activando la regulación de la respuesta inmune [Salomon y Webster 2009]. Es evidente que tanto la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células juegan un rol de suma importancia en el control de la infección por el virus Influenza. Los anticuerpos producidos en respuesta a la infección reducen la carga viral y restringen ostensiblemente

la reinfección, mientras que las células T citotóxicas destruyen activamente las células del epitelio respiratorio infectadas y hasta podrían provocar cierta supresión por citoquinas [Hilleman 2002].

1.2.8 Características moleculares de la replicación.

En la parte final de cada segmento de RNA se forma una horquilla helicoidal [Bae *et al.*, 2001] que está unido por el complejo heterotrimérico de polimerasas, el resto del segmento está cubierto abundantemente con arginina. Cada segmento posee regiones no codificantes de longitudes variables y ambas en dirección 3' y 5' (12 nucleótidos en 3' y 13 nucleótidos en 5'). La única variación conocida (U/C) ocurre en la posición 4 del extremo 3' y esta variación está implicada en la expresión diferencial de los genes [Straw *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009; Desselberger *et al.*, 1980]. Sin embargo los extremos finales de cada segmento viral son altamente conservados; estas secuencias terminales parcialmente complementarias funcionan como el promotor para la replicación y transcripción por el complejo de polimerasas. Las regiones no codificantes, también se incluyen la señal de poliadenilación del RNAm y parte de las señales de empaquetamiento para el ensamblaje del virus [Baudin *et al.*, 1994; Compans *et al.*, 1972; Murti *et al.*, 1988]. Ver imagen 3.

Imagen 3. Elementos conservados en las terminaciones 3' y 5' de los virus de influenza. [Zhou *et al.*, 2009]



- A) Clásica horquilla helicoidal: representación de apareamiento de bases **entre los términos 3' y 5'** que se produce en cada uno de los segmentos de ARN genómico.
- B) Composición de los segmentos de ARN genómicos del virus de influenza.

La subunidad PB1 posee la RNA polimerasa activa responsable de la elongación de RNA, mientras que la subunidad PB2 por una parte, se une específicamente al ARNm derivado del hospedador y está implicado en el proceso de la tapa-robo. La subunidad PA juega un papel fundamental en la transcripción, la actividad de replicación, el tapón de unión, unión a promotor y como una endonucleasa, sin embargo estas funciones aun no están completamente estudiadas [Wanitchang *et al.*, 2011; Biswas y Nayak 1994; Fechter *et al.*, 2003; Días *et al.*, 2009].

1.3 PRUEBAS DE DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la influenza en cerdos puede ser difícil de diferenciar de otro tipo de infecciones respiratorias si solamente nos basamos en signos clínicos, ya que estos pueden ser muy similares a otros cuadros respiratorios. En los brotes típicos puede hacerse un diagnostico provisional con base en los hallazgos clínico-patológicos, pero debe confirmarse mediante el aislamiento del virus o por la demostración de la presencia de anticuerpos específicos [González *et al.*, 1990].

El aislamiento viral se puede realizar de secreciones respiratorias con un hisopo nasal o muestras de pulmón. Existen 2 opciones para realizar el aislamiento: la primera consiste en la utilización de diversas líneas celulares que permiten el crecimiento del virus como las células de pulmón de feto de cerdo, células de riñón canino (MDCK), células de riñón de cerdo, fibroblastos de embrión de pollo, células diploides humanas y conjuntivales de Chang. Otros sistemas incluyen una línea de células de oviducto porcino y una línea de células de testículo de cerdo (ST) la segunda opción consiste en utilizar embriones de pollo y éste es el sistema de cultivo utilizado con mayor frecuencia. Por otro lado, se disponen pruebas para detectar el antígeno como la Inmunofluorescencia (IF) e Inmunohistoquímica (IHQ) [Pérez 2009].

El monitoreo serológico ha llegado a ser problemático debido a las múltiples cepas antigénicas que circulan hasta el día de hoy. La serología ha sido útil como un indicador retrospectivo de la presencia del virus de influenza en una piara. La prueba más utilizada es la Inhibición de la hemoaglutinación (IH), es una prueba básica aprobada como uno de los métodos oficiales por parte de la Organización Mundial de la Salud (OIE), que se realiza actualmente en diferentes laboratorios, es rápida, económica y fácil de estandarizar, además tiene la ventaja que es una prueba cuantitativa. Otras pruebas que disponemos son el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) y fijación del complemento [Dee 1996; Morilla *et al.*, 2004; Rosales].

1.3.1 Diagnóstico Molecular

En la actualidad se tiene un gran número de métodos moleculares que pueden ser empleados para la detección del virus de influenza y la mayoría están basados en metodología de PCR [Ellis y Zambon 2002]. El uso de técnicas moleculares como la Transcriptasa Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) han proporcionado alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de enfermedades infecciosas lo cual permite su utilización como un complemento de otras pruebas de diagnóstico [Gramer 2005; Beltran *et al.*, 2007]. Se utiliza para evidenciar la presencia del ácido nucleico y determinar el subtipo viral. La elevada sensibilidad y especificidad, la convierten en una excelente herramienta de diagnóstico y es la técnica base para la caracterización genética de estos virus [Gramer 2005; Ellis y Zambon 2002; Beltran *et al.*, 2007]. Los productos de amplificación obtenidos con iniciadores que amplifican regiones de alta variabilidad genética pueden analizarse por secuenciación u otras técnicas, como el análisis del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). La innovación al diagnóstico por PCR aplicada con éxito a los virus de influenza, constituye la PCR en tiempo real, que ofrece resultados cuantitativos, rápidos y sensibles. Este tipo de análisis con el complemento de los análisis antigénicos, ayudan a decidir el diseño actual de las vacunas en medicina veterinaria y son utilizados para detectar la redistribución de genes o para elucidar el origen y la evolución de los virus de influenza [Ellis y Zambon 2002; Beltran *et al.*, 2007].

Los microarreglos de DNA son una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas. Son un conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie (10,000 muestras por cm²). Posiblemente es una de las aplicaciones más importantes para la información obtenida de la secuenciación sistemática de los genomas completos. La capacidad de la superficie para la detección simultánea para muchas secuencias de ácido nucléico, que implica la tecnología de microarreglos ofrece un gran potencial como herramienta de diagnóstico. Estudios sobre la aplicación de los métodos basados en microarreglos o matriz de diagnóstico, han comenzado a realizarse y un protocolo de ADN modelo ha sido descrito recientemente para la tipificación y subtipificación de la influenza humana A y B [Ellis y Zambon 2002; Pease *et al.*, 1994; Schena *et al.*, 1995].

1.4 EPIDEMIOLOGIA.

La epidemiología de la influenza es compleja, ya que predominan factores como el número de posibles hospederos y la capacitación intrínseca de los virus durante los cambios genéticos y antigénicos.

Todas las 17 hemaglutininas y las 9 neuraminidasas conocidas del virus de influenza tipo A han sido aislados de aves acuáticas silvestres y aves marinas [Wenjun *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2006]. Aunque algunos subtipos no son patógenos ni virulentos en sus huéspedes naturales y han estado presentes en estos reservorios animales durante muchos siglos, diversos subtipos son altamente virulentos dentro de sus especies, huéspedes naturales y otras especies [Wenjun *et al.*, 2009; Webby *et al.*, 2007]. Por ejemplo, el cambio del virus altamente patógena gripe aviar

(HPAIV) subtipo H5N1 en patos salvajes y domésticas ha sido recientemente documentado como un peligro para la salud pública, ya que son potenciales agentes zoonóticos [Wenjun *et al.*, 2009; Hulse *et al.*, 2005]. La ecología de los virus de influenza es dinámica y compleja e involucra múltiples especies hospedadoras y genes virales. Granjas comerciales de pollos, “mercados de vendimia de animales vivos”, animales de traspatio, instalaciones avícolas y mataderos, granjas porcinas de traspatio, humanos y el comercio mundial de animales exóticos han sido implicados en la propagación del virus de influenza A [Wenjun *et al.*, 2009; Greger 2006].

Los cerdos son el principal reservorio para los virus de influenza subtipo H1N1, H1N2 y H3N2 los cuales son endémicos en esta especie alrededor del mundo y son responsables de enfermedades respiratorias con mayor prevalencia. Como resultado de múltiples introducciones de virus humanos y aviares, eventos recombinantes y/o separaciones geográficas, existen distintos linajes dentro de cada uno de los tres subtipos antigénicos porcinos. Estos virus que circulan en la población porcina de Europa y Norte América son genéticamente y antigénicamente distintos [Brown 2000; Naffakh y Van Der Werf 2009; Van Reeth 2007].

1.4.1 Antecedentes sobre la presencia de virus recombinantes de influenza porcina.

La importancia de la influenza en la especie porcina radica en la mezcla de los genes (“teoría de las mezclas basales”) [Scholtissek 1990] de los virus de influenza porcina, humana y aviar, de esta manera aparecen nuevas

cepas que potencialmente pueden llegar a ser más patógenos para los cerdos e inclusive para el humano [Morilla 2009; Wenjun *et al.*, 2009; Scholtissek 1990].

Las mezclas de virus de influenza aviáres y humanos, conducen a pandemias humanas como la del continente Asiático en 1957 por un virus H2N2 y la de Hong Kong en 1968 por un virus H3N2. La participación de la recombinación entre diferentes virus de influenza en las pandemias de 1957 y 1968 muestran el gran riesgo en humanos; un ejemplo es la presencia en cerdos de un subtipo del virus de influenza H9N2 (similar al virus H5N1) semejantes a los transmitidos de aves a humanos [Trujano y Palacios 2005; Brown 2000; Wenjun *et al.*, 2009], por lo tanto la recombinación genética entre los virus de influenza del humano y de origen no humano se considera un mecanismo probable de aparición de nuevas cepas pandémicas humanas. No hay evidencia directa de que los eventos de reordenamiento en los virus de la influenza que culminaron en pandemias en 1918, 1957 o 1968 se hayan originado a partir de cerdos [Ducatez *et al.*, 2008; Wenjun *et al.*, 2009; Quinn 2008].

Los reordenamientos genéticos de los virus de influenza en aves, humanos y/o cerdos han sido documentados en la especie porcina. Después de la transmisión a los cerdos los virus de la gripe aviar y humana se someten a la evolución divergente y se establecen nuevas líneas genéticas [Vincent *et al.*, 2009; Karasin *et al.*, 2002; Webby *et al.* 2004]. Peiris y colaboradores en el 2001 encontró que el subtipo H9N2 aviar y un contemporáneo subtipo viral de origen humano H3N2 estaban co-circulando en cerdos en el sur

este de China, creando una oportunidad para recombinar sus segmentos, dicho lo anterior aislaron un doble reordenamiento H3N2 (humano y aviar) y un triple reordenamiento H3N2 (humanos, porcino y aviar) [Peiris *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008].

El primer virus de cerdos fue aislado en Iowa en 1930 por Shope y colaboradores y fue un H1N1, este virus fue muy estable de 1930 a 1998. Para 1998, solo el virus clásico H1N1 de influenza porcina era aislado de cerdos en Estados Unidos. En 1998, el doble (Humano/porcino H3N2) y el triple (aviar/porcino/humano H3N2, H1N2, H1N1 y H3N1) reordenamiento del virus de influenza porcina emergieron en los Estados Unidos y Canadá. Estos hechos proporcionan pruebas concluyentes de que los cerdos pueden actuar como un "mezcladores" para el virus de la gripe [Olsen *et al.*, 2006; Karasin *et al.*, 2006].

El doble recombinante H3N2 fue el primero en aislarse en cerdos durante una severa enfermedad parecida a la influenza en granjas del Norte de Carolina en 1998. El análisis genético del virus demostró que el aislado contenía genes del linaje clásico porcino (NS, NP, M, PB2 y PA) y un reciente virus de influenza humana (HA, NA y PB1). Subsecuentemente el triple reordenamiento H3N2 aislado de cerdos en Minnesota, Iowa y Texas contenía segmentos genéticos del virus clásico porcino (NS, NP y M), virus humano (HA, NA y PB1) y virus aviares (PB2 and PA) [Zhou *et al.*, 1999]. Posteriormente, el triple reordenamiento H3N2 evoluciono a través de un cambio antigénico ("*drift*") y recombinaciones génicas ("*shift*") con virus

clásicos porcinos H1N1 para generar un nuevo virus H1N2 [Wenjun *et al.*, 2009].

Algo común entre todas estas nuevas reasociaciones es el mantenimiento molecular definido por los genes internos específicos que representan los genes PB1, PB2, PA, NP, M y NS, llamado así conjunto de Genes Internos Triple Reordenamiento (TRIG), derivado originalmente de un virus H3N2 triple reordenamiento. Desde el 2005, presentaciones del virus H1 parecidos al humano que son genéticamente y antigénicamente diferentes del clásico linaje porcino H1, fueron identificados en cerdos en Canadá y se han distribuido en granjas de Estados Unidos [Karasin *et al.*, 2006; Gramer 2008]. Los seis genes internos del virus H1 humano parecen ser similares a los encontrados en el conjunto TRIG del virus contemporáneo triple reordenamiento. Esto sugiere que el conjunto TRIG puede aceptar múltiples tipos de HA y NA y podría dotar de una ventaja selectiva a los virus porcinos que los posean. Asombrosamente el triple reordenamiento H3N2 con una leucina en la posición 226 y glicina en la 228 de la HA similar a los aislados tempranos de los años 1957 del virus pandémico humano H2N2, fueron aislados en el 2006 de cerdos de Missouri [Wenjun *et al.*, 2006]. Los nuevos virus porcinos H3N2 eran capaces de causar enfermedad en cerdos, ratones y hurones, eran muy infecciosos y muy contagiosos entre los cerdos y hurones sin adaptación previa [Wenjun *et al.*, 2009].

1.5 EVOLUCIÓN GENÉTICA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA

Recientes estudios relacionados con la evolución de los virus de influenza son llevados a cabo en virus de origen humano, donde los hospederos

INTRODUCCIÓN

ejercen mayor presión inmunológica sobre las proteínas de superficie que evoluciona más rápido que los genes internos. La proporción total de cambios silenciosos de nucleótidos en las proteínas de superficie en comparación con los genes de proteínas internas revela diferencias en la evolución. Además, la comparación de regiones codificantes y no codificantes de los virus humanos, nos muestra que están evolucionando a un ritmo diferente, como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Tasa de evolución de nucleótidos del virus de influenza, basados en análisis filogenéticos

Gen/Hospedero	Tasa de evolución 10^{-3} bases/año			Porcentaje de cambios silenciosos	Número de virus que estimaron la tasa de evolución
	Segmento total	Cambios codificantes	Cambios no codificantes		
PB1 humano	0.87				
PB2 humano	1.82	0.15	1.67	92	7
PA humano	1.32				4
HA					
H3 humano	7.0				16
H3 humano	4.44	1.91	2.53	57	14
H3 equino	2.8				2
H3 equino	1.74	0.45	1.29	74	13
H1 humano	4.3				14
H1 humano	0.61				5
H1 cerdo	1.26				9
NP					
NP humano	2.2				9
NP humano	2.18	0.42	1.76	81	16
NP cerdo	2.12	0.22	1.9	90	11
NP ave-cerdo	2.88	0.47	2.4	83	3
NP equino	0.78	0.21	0.57	73	4
NP ave	1.21	0	1.21	100	19
M Humano					
M1	0.83	0.03	0.8	96	13
M2	1.36	0.46	0.9	66	13
M Cerdo					
M1	1.43	0.05	1.38	97	8
M2	0.91	0.48	0.43	47	8
NS humano					
NS humano	1.94				9
NS humano	1.78				14

Webster *et al.*, 1992

Para el virus H3N2 las tasas de evolución de virus de humanos son de (0.0122/sitio/año), en cerdos (0.0127/sitio/año) y en aves (0.0193/sitio/año), esto nos dice que los genes son similares, esto según las sustituciones sinónimas. En genes virales derivados de virus humanos y porcinos las sustituciones no sinónimas se desarrollan alrededor de tres veces más rápido (0.0026--0.0027/sitio/año), en comparación con los virus aviares. (0.0008/sitio/año). Además, el mecanismo evolutivo por el cual los genes virales de H3 humanos y porcinos evolucionan a un ritmo similar, según las sustituciones no sinónimas, parece ser muy diferente de las pruebas anteriores, las que mostraron que la H1 de genes humanos evolucionan tres veces más rápido que las de los virus porcinos. La comparación del número de sustituciones no sinónimas en los sitios antigénicos (A-E) de moléculas de la hemoaglutinina han demostrado que los virus porcinos evolucionan a un ritmo menor (hasta 5 veces menos) que los virus humanos, lo que refleja la naturaleza conservadora de la estructura antigénica en el primero.

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

están más conservados. Los genes de virus H3N8 equino, han venido evolucionado con mayor lentitud que los virus humanos o porcinos [Webster *et al.*, 1992; Gorman *et al.*, 1990]. Substituciones estimadas en los genes M y NS en 5.4×10^{-4} y 5.1×10^{-4} /por sitio/por año respectivamente [Lindstrom *et al.*, 1998].

Las subunidades M1 y M2 del gen M están evolucionando de manera muy diferente el uno del otro y encajan en el modelo de evolución de proteínas internos o externos que se acaban de mencionar. La proteína de superficie M2 tiene cambios mucho más rápidos que la proteína interna M1 y ésta alta proporción de cambios de nucleótidos en M2 son no silenciosos [Webster *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1991].

1.6 GENÓMICA Y BIOINFORMÁTICA APLICADAS AL VIRUS DE INFLUENZA.

Las ciencias genómicas han tenido un importante auge en los últimos años, sobre todo gracias a las tecnologías avanzadas de secuenciación de ADN, a los avances en bioinformática, y a las técnicas cada vez más sofisticadas para realizar análisis de genomas completos. El desarrollo de la genómica ha contribuido al avance de distintos campos de la ciencia como la medicina, la agricultura, entre otras; gracias al descubrimiento de secuencias de genes necesarias para la producción de proteínas de importancia médica y a la comparación de secuencias genómicas de distintos organismos.

La bioinformática se fundamenta en la aplicación de programas de cómputo, basados principalmente en métodos de algoritmos matemáticos que ofrecen información relevante al estudio de agentes infecciosos desde

el punto de vista genético, evolución, propiedades antigénicas, entre otras [Meléndez *et al.*, 2005].

Uno de los ejemplos más importantes relacionado con el virus de la influenza A es la gran pandemia del año 1918, la “influenza española” [Taubenberger y Morens 2006]. Recientemente, este virus pandémico fue recuperado de muestras de tejido humano provenientes de individuos que fallecieron de influenza y parcialmente secuenciados los genomas, A/BrevigMission/1/1918, (GenBank. AF116575), A/South Carolina/1/1918, (GenBank. AF117241) A/New York/1/1918 (GenBank. AF116576) [Reid *et al.*, 1999]. Esta información ha motivado a realizar la comparación genómica con otros virus de la influenza aislados de brotes epidémicos en zonas geográficas diferentes e incluso de anteriores pandemias y deducir sus características de virulencia.

Toda la información generada de la secuenciación genómica de los virus en general y en particular de los virus de la influenza es mantenida y clasificada en bancos electrónicos de información. Todo esto, sin duda, ha servido de gran apoyo a la comunidad científica mundial para plantear nuevos proyectos de investigación biomédica o epidemiológica.

1.7 REPORTE VIRALES EN CERDOS Y EL VIRUS A/H1N1 EN MÉXICO.

Se han reportado virus aviares en la especie porcina así, como realizado infecciones experimentales en cerdos con virus aviares H1 – H13 y podrían también ser susceptibles para H14 a H17. Históricamente un número limitado de subtipos virales han sido aislados rutinariamente de cada especie de mamíferos sin embargo, en varias regiones del mundo se han

aislado del cerdo otros subtipos de influenza tipo A de manera esporádica sin que estos prevalezcan en la especie.

Históricamente, un número limitado de subtipos virales han sido aislados rutinariamente de cada especie de mamíferos, sin embargo, en varias regiones del mundo se han aislado del cerdo otros subtipos de Influenza tipo A de manera esporádica sin llegar a establecerse dentro de la especie.

Por ejemplo tenemos los siguientes:

- H1N7: Aislaron el virus A/swine/Eng/195852/92 con orígenes H1N1 humano y H7N7 de caballos [Brown 2000; Brown *et al.*, 1994].
- H9N2: Los ocho genes de este virus proveniente de cerdos mostraron alta homología con A/Pigeon/Nanchang/20461/00 y con A/Wild Duck/Nanchang/2-0480/00 [Yu *et al.*, 2008].
- H4N6: En Canadá y EUA reportan el aislamiento del este virus en cerdos. El análisis de secuencia de los segmentos genómicos reveló que se trataba de virus aviares de linaje americano [Alexander *et al.*, 2000].
- H3N3: Aislado reportado en cerdos de Canadá. Ese virus estaba filogenéticamente relacionado con virus de aves acuáticas y era antigénicamente distinto de los virus circulantes en las poblaciones porcinas de Norteamérica [Karasin *et al.*, 2004].
- H3N8: Aislaron en China provenientes de cerdos, dos virus A/swine/Chibi/01/2005 (

s [Tu *et al.*, 2009; Payungporn

et al., 2008].

- H3N1: Reportado en Taiwán, Corea y EUA. Este subtipo viral no se había reportado previamente en Europa, sin embargo, en Italia en el 2006, Moreno A *et al.*, describe el aislamiento de un virus de influenza H3N1 proveniente de cerdos. La tipificación antigénica y la caracterización genética sugiere que el nuevo aislamiento fue una recombinación entre el virus H1N1 y H3N2 circulantes en Italia [Moreno *et al.*, 2009].
- H2N3: En E.U. en el 2006 se reportó el aislamiento de un virus H2N3, del cual no se tenían reportes en cerdos. Se observó que este virus contenía genes derivados del virus de la influenza aviar y porcina [Wenjun *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011].

Por otra parte, en el mes de marzo y principios de abril del año 2009, se detectaron los primeros casos de Influenza A/H1N1 en México y Estados Unidos, este virus se extendió rápidamente en el mundo transmitiéndose a humanos con facilidad, causando la primera pandemia de gripe del siglo XXI [Dawood *et al.*, 2009]. La caracterización genética y el análisis filogenéticos de estos virus mostraron que la cepa pandémica era de origen porcino. Se representó un virus que contiene genes PB1, PB2, PA, HA, NP y NS de un virus porcino triple reordenado Norte Americano, mientras que dos genes NA y M se derivaron de un virus porcino de linaje Eurasiático [Garten *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010]. Ver Imagen 4.

INTRODUCCIÓN

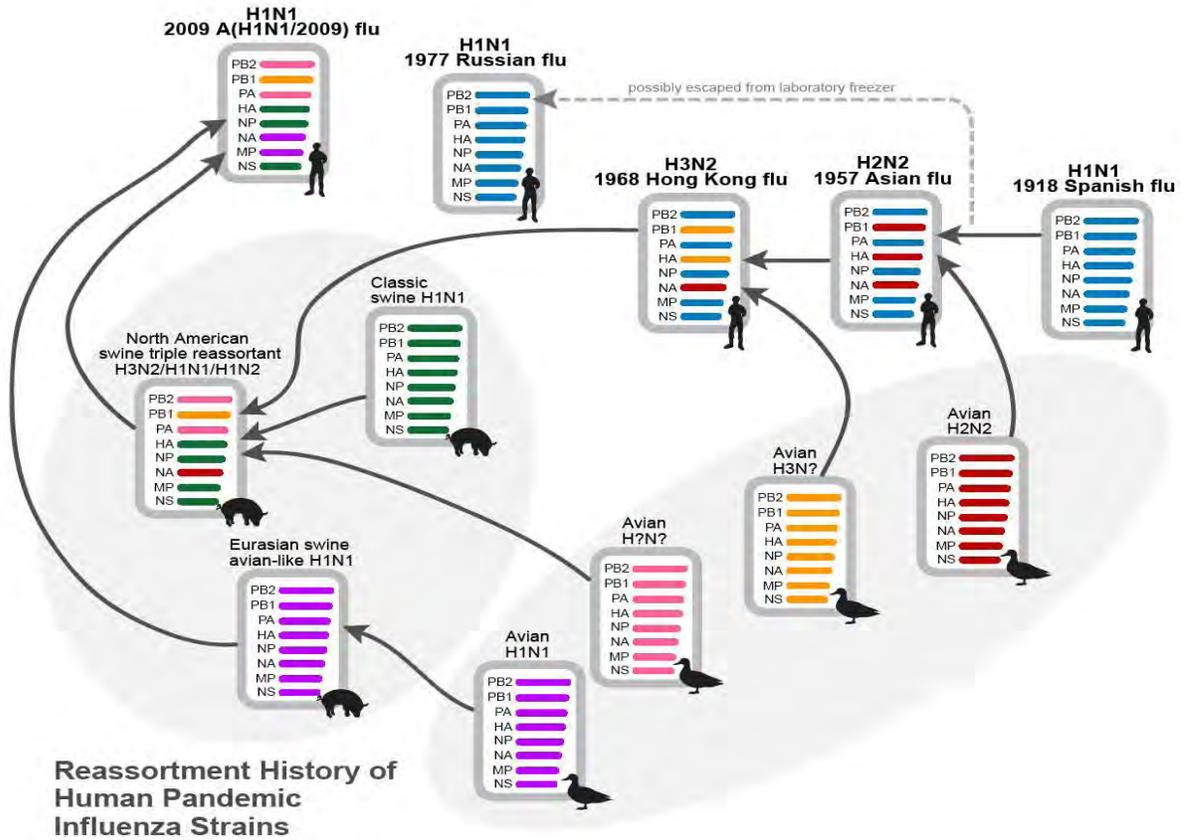


Imagen 4. Diagrama esquemático que muestra la historia de los reordenamientos de las cepas de pandémicas de influenza. [Tang et al., 2010].

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que se desconoce el linaje de los virus de influenza porcina que circulan actualmente en México, es necesario realizar estudios empleando técnicas de diagnóstico molecular que involucren análisis bioinformáticos para determinar variantes genéticas dentro del genoma, así como las mutaciones implicadas.

3. HIPÓTESIS

Dados los reportes de reordenamientos genéticos y capacidad mutagénica de los virus de influenza, en este estudio pretendemos encontrar mutaciones y genes internos procedentes de otras especies

4. OBJETIVO

Identificar la variabilidad genética (mutaciones) en los genes internos PB2, PA, NP y M de aislamientos virales obtenidos durante el 2010, mediante un alineamiento múltiple de secuencias para generar homologías putativas e inferir el patrón de evolución de estos aislamientos con relación a secuencias registradas en el Genbank del NCBI.

5. METODOLOGÍA

5.1 SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS VIRALES.

Los aislamientos virales utilizados y genotificados, se obtuvieron a partir de un muestreo en 18 estados de la República Mexicana a nivel de rastro, de un estudio precedente a este trabajo [Avalos *et al.*, 2013]., donde de un total de 123 granjas, 5,6% resultaron positivos mediante la técnica de RT-PCR para el gen M. Siete aislamientos virales se utilizaron en este estudio, realizado en el laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 (BSL3) durante el 2010 y que se encuentra ubicado en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los aislados iniciales fueron replicados nuevamente, debido a la carencia de volumen para ser trabajados. Al final, se utilizaron siete aislamientos virales de influenza porcina. Los aislamientos que se trabajaron se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. *Caracterización genotípica de los aislados virales de Influenza Porcina.*

Aislamiento	Nomenclatura NCBI	Subtipo
1	A/swine/México/Mex19/2010(H1N1)	H1N1
2	A/swine/México/Ver29/2010(H1N1)	H1N1
3	A/swine/México/Qro35/2010(H1N1)	H1N1
4	A/swine/México/Ver37/2010(H1N1)	H1N1
5	A/swine/México/Mich40/2010(H3N2)	H3N2
6	A/swine/México/Mex51/2010(H3N2)	H3N2
7	A/swine/México/Mex52/2010(H1N1)	H1N1

Además de los aislados obtenidos, se utilizaron los virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) como controles internos.

5.2 REPLICACIÓN VIRAL.

Se replicaron previamente, los controles de referencia y aislamientos obtenidos de la siguiente manera: Se inoculó de manera estéril en una campana de flujo laminar, 200µL del virus en embriones de pollo ALPES1[®] Libres de Patógenos Específicos (SPF) de 9-11 días de edad. Se inocularon en cavidad alantoidea y se incubaron a 37°C. La colecta del líquido corioalantoideo se realizó a las 24, 48 y 72hrs. posterior a la inoculación, en tubos de 10mL para después centrifugarlo a 3,500 rpm / 5 min.

5.3 TITULACIÓN VIRAL.

Se titularon los virus por hemoaglutinación:

- a. Se colocó 50µL de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) con un pH de 7 a 7.5 en una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo en “U”.
- b. Se colocó 50µL de virus y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 2 hasta 4096.
- c. Se colocó 50µL de una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% preparados con PBS a toda la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los botones del control de eritrocitos para posteriormente realizar la lectura.
- d. Los virus que tuvieron títulos ≤ 128 UHA (Unidades Hemoaglutinantes) fueron seleccionados para la extracción viral.

Los aislamientos fueron alicuotados en tubos eppendorff con volumen de 500µL y almacenados posteriormente a -80°C hasta ser trabajados.

5.4 EXTRACCIÓN DE RNA.

La extracción del RNA de los aislamientos virales se realizó con dos métodos de extracción.

El *primer método*, fue para la identificación de los cuatro genes bajo el protocolo estandarizado por GIBCO-BRL, Life Technologies, 1996 de la siguiente manera:

- a. Se colocó 500µL de antígeno en un tubo eppendorff.
- b. Se le adicionó 800µL de Trizol[®] Reagent y se homogenizó suavemente.
- c. Se incubó por 10 min a 4°C.
- d. Posteriormente se adicionó cloroformo frio (4°C) y se homogenizó en un agitador tipo “vortex” por 10 seg.
- e. Se incubó por 5 min a 4°C.
- f. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min.
- g. Después se separó la fase acuosa de RNA de la fase orgánica en un nuevo tubo eppendorf (aprox. 800µL).
- h. Se colocó el mismo volumen de colecta con isopropanol frio (4°C) para después homogeneizarse en el agitador “vortex” por 10 seg.
- i. Se incubó por 15 min a 4°C.
- j. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.
- k. Se decantó el isopropanol.
- l. Se lavó la pastilla (RNA) con 200µL de etanol al 70% preparado con agua DEPC al 1% y se homogenizo en vortex por 10 seg.
- m. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.

- n. Se decantó el etanol.
- o. Se dejó secar la pastilla durante 24 hrs.
- p. Se re suspendió la pastilla de RNA en 50µL de agua DEPC (Dietilpirocarbonato) al 0.1% homogenizando la muestra.

El *segundo método*, se utilizó con el fin de obtener de manera “pura” el RNA y realizar la RT-PCR Multisegmentos (M-RT-PCR), para obtener los cuatro segmentos génicos de interés, para ello se utilizó el kit comercial PureLink™ Viral RNA/DNA Kits y se realizó de la siguiente manera:

- a. Se tomaron 200µL de muestra y se colocaron en un tubo eppendorff
- b. Se añadió 25µL de Proteinasa K, 200µL de Buffer de Lisis, además de 5µL de RNA acarreador.
- c. Se homogenizó en el agitador “vortex” durante 15 seg.
- d. Se incubó por 15 min. en baño maría a 56°C
- e. Posteriormente se centrifugo a 14,000 rpm durante 15 seg.
- f. Se añadieron 250µL de etanol absoluto y se volvió a agitar en “vortex” por 15 seg.
- g. El contenido del tubo eppendorff se transfirió íntegramente a una columna con microfiltro.
- h. Se centrifugó a 9,000 rpm durante 1 min.
- i. Se desechó el sobrenadante y se cambio el tubo colector.
- j. Se adicionaron 500µL de Buffer de Lavado, para volver a centrifugarse 9,000 rpm durante 1 min. Esto se repitió 2 veces.
- k. Se centrifugó a máxima velocidad por 1min, se desechó el sobrenadante y se cambio el tubo colector por un tubo eppendorff.

l. Se adicionó a la columna con microfiltro 20µL de agua libre de RNAsas para después centrifugarse 9,000 rpm durante 1min. Esto se repitió 2 veces.

m. Finalmente el volumen total fue de 40µL de RNA purificado.

5.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Para la realización de la RT-PCR Multisegmentos se tomaron en cuenta los oligonucleótidos de referencia reportados [Zhou *et al.*, 2009] como se observa en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. *Secuencia de oligonucleótidos para la RT-PCR Multisegmentos para el virus de influenza porcina*

Oligonucleótido	Orientación	Secuencia
MBT Uni-12	3' – 5'	ACGCGTGATCAGCAAAGCAGG
MBT Uni-12	5' – 3'	ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG

El diseño de oligonucleótidos utilizados para la identificación de los segmentos génicos, se realizó con el software bioinformático Clone Manager V.7.0®

Se alinearon aproximadamente 50 secuencias virales del Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para cada uno de los genes PB2, PA, NP y M con la secuencia del virus control A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2) y así, poder equiparar regiones conservadas y comenzar el análisis.

Se ajustaron las especificaciones para que el diseño fuera fidedigno y evitar errores de especificidad y sensibilidad.

Las condiciones fueron las siguientes:

a. Tamaño promedio entre 18 y 30pb.

- b. Concentración de G + C entre 40 y 60%.
- c. Evitar secuencias largas de una sola base.
- d. Los extremos 3' que no sean complementarios para evitar la formación de dímeros.
- e. Que la temperatura de alineación en ambos oligonucleótidos sea similar entre 50 y 65°C.

Los oligonucleótidos obtenidos se presentan a continuación en cuadro 5.

Cuadro 5. *Secuencia de oligonucleótidos para la RT-PCR de los genes PB2, PA, NP y M del virus de influenza porcina.*

Gen	Tamaño pb	Secuencia	Amplicón pb
PB2	Fw 25	3'GATCTGATGTCGCGAGTCCGCGCACTC'5	384
	Rw 22	5'TCTGAAGTGGACAGGGCCGAAG'3	
PA	Fw 22	3'GAGACCGAATCATGGCCTGGAC'5	596
	Rw 20	5'TGACCGCTGATGGCAAAGAG'3	
NP	Fw 26	3'GCGCCAAGCAAACAATGGTGAAGATG'5	475
	Rw 23	5'AGCAGGCAGGCAAGACTTATGTG'3	
M	Fw 25	3'CTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGAC'5	330
	Rw 20	5'GCCCATGCAACTGGCAAGTG'3	

Por último se realizó un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, para la validación específica de los oligonucleótidos señalados, homología, cobertura y la identidad entre especies que comparte los genes correspondientes.

5.6 TÉCNICA DE RT-PCR.

5.6.1 RT-PCR para la identificación de segmentos génicos.

Para la estandarización de las reacciones de la PCR, fueron utilizados los virus de referencia. El RNA de los controles virales fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA), que mostró

las siguientes concentraciones promedio: Virus H1N1 205.2 ng/μl y para el Virus H3N2 185.4 ng/μL. Se realizaron 5 diluciones dobles seriadas de cada control en un volumen final de 10μL. Los iniciadores se trabajaron a 15 picomolar. El ensayo se realizó con temperaturas en gradientes a partir de la Tm indicada por el proveedor del diseño sintético de oligonucleótidos y el establecido por el software Clone Manager V.7.0® .

Se utilizó el kit de QIAGEN® “OneStep RT-PCR Kit”. Los reactivos se utilizaron con las mismas concentraciones para las diferentes reacciones.

Finalmente la reacción de RT-PCR se ajustó a un volumen final de 10 μL para optimizar los reactivos del kit con las siguientes cantidades que se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. *Volumen final de la reacción de RT-PCR para el virus de influenza porcina.*

Reactivos	Volumen
Agua libre de RNAsas	3.3 μL
5x Buffer	2 μL
Q Buffer	2 μL
dNTP's	0.4 μL
Oligonucleótidos Forward + Reverse	0.4 μL
Mix de enzimas	0.4 μL
Muestra de la extracción de RNA	1.5 μL
Volumen Total	10 μL

El protocolo de tiempos y temperaturas para la reacción de RT-PCR se estableció en un Termociclador Labnet® International Inc. Multigene Modelo TC9600-G. Software V3.3.34.B, bajo las siguientes condiciones:

- Una temperatura para Transcriptasa Reversa (RT): 50°C/30min.
- Una temperatura de Desnaturalización inicial: 95°C/15min.
- 30 ciclos de desnaturalización, alineación y extensión.

- Desnaturalización: 94°C/30seg.
 - Alineación: 56°C/1 min.
 - Extensión: 72°C/1min.
- d. Temperatura de extensión final: 72°C/10min.
- e. Temperatura final de conservación de la muestra: 4°C/10min

5.6.2 RT-PCR Multisegmentos (M-RT-PCR)

Para esta reacción de M-RT-PCR, se utilizó el kit de Invitrogen® “SuperScript™. One-Step RT-PCR with Platinum® Taq” con los oligonucleótidos y el protocolo de tiempos y temperaturas [Zhou *et al.*, 2009] con las siguientes cantidades que se muestran a continuación en el cuadro 7.

Cuadro 7. *Volumen final de la reacción de RT-PCR Multisegmentos para el virus de influenza porcina.*

Reactivos	Volumen
2x reaction mix	25 µL
Template RNA	5 µL
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
RT Platinum® Taq Mix	1 µL
Agua DPEC	17 µL
Volumen Total	50 µL

El protocolo de tiempos y temperaturas para la reacción de RT-PCR se estableció en un Termociclador Labnet® International Inc. Multigene Modelo TC9600-G. Software V3.3.34.B de la siguiente forma:

- a. 42°C/60 min.
- b. 94°C/2 min.
- c. 5 Ciclos:

- 94°C/30 seg.
 - 45°C/30 seg.
 - 68°C/3 min.
- d. 31 Ciclos:
- 94°C/30 seg.
 - 57°C/30 seg.
 - 68°C/3 min.
- e. Temperatura final de conservación de la muestra: 4°C/10min.

5.6.3 Preparación de geles de agarosa y Electroforesis

Los geles de agarosa fueron preparados con una concentración del 3% en un volumen final de 30mL.

Se utilizó una cámara de electroforesis CLP Bioscience Modelo 75.710, con una fuente de poder (BIO-RAD Power PAC 300) donde se ajustó el tiempo y voltaje de acuerdo al tamaño de amplicón, concentración del gel y buffer de corrida utilizado.

Se utilizó una solución TAE 1x (Tris Ácido Acético EDTA) como Buffer de corrida. Se cargaron los productos de PCR en los geles con 5µL y 3µL de Buffer de carga 6X DNA Loading Dye de Fermentas® Life Science.

Los Marcadores de Peso Molecular (MPM) utilizados fueron diferentes y se cargaron 3µL en el gel. Para identificar los segmentos génicos individuales se utilizó el MPM pUC Mix Marker, 8 ready-to-use, de Fermentas® Life Science con 17 fragmentos en pares de bases (1118, 881, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 34, 26 y 19). Mientras que, para la RT-PCR Multisegmentos se utilizó el MPM TrackIt™ 1Kb Plus DNA

Ladder, de Invitrogen® con 20 bandas en pares de bases (100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000 y 12000).

Se tiñeron los geles en bromuro de etidio (Br-e) durante 10-15 min y se visualizaron en un transiluminador Kodak Gel Logic 112, con cámara Kodak Molecular Imaging Software V.5.0.1.27 Standar Edition 2008.

5.7 SECUENCIACIÓN.

La preparación de la biblioteca Illumina y secuenciación del genoma completo fueron realizadas en las instalaciones de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, que trabaja con equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 y realizando el método Taq Fs Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence–Based Sequencing. En total, 200 bibliotecas de pares de bases de tamaño se prepararon utilizando mRNA-Seq8 kits de preparación de muestras de Illumina siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, las muestras se cargaron en los carriles separados de una celda de flujo de un analizador de Genoma Ilx (Illumina, San Diego, CA).

5.8 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Una vez obtenidas las secuencias consenso, se buscó secuencias con identidad y cobertura a través de la herramienta BLASTn (The Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para dar alcance a la calidad de las secuencias editadas y alineadas previamente por el IBT. Posteriormente, se eligieron secuencias con criterios de cobertura e identidad (arriba de 95% respectivamente) para

su posterior análisis. Las secuencias de los virus pandémicos de referencia fueron elegidos por diferentes circunstancias: El virus A/México/InDRE4487/2009(H1N1) por ser parte del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) a través de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) para la vigilancia epidemiológica acreditado; el virus A/México/LaGloria-3/2009(H1N1), como uno de los aislamientos en la "zona cero" donde se llevó cabo la pandemia del 2009; y finalmente, el virus A/México City/005/2009(H1N1) que se inscribe en el Proyecto de Secuenciación del Genoma de la influenza (IGSP). Las secuencias virales registrados en México servirán para observar si estas cepas porcinas tienen una relación ancestral con los virus de la pandemia en México. Su información se observan en el siguiente cuadro 8.

Cuadro 8. *Caracterización genotípica de los virus pandémicos de influenza A/H1N1.*

Aislamiento	Nomenclatura	Acceso GenBank	Genotipo
1	A/México/InDRE4487/2009(H1N1)	PB2:FJ998206.1 PA: FJ998223.1 NP: FJ998217.1 M: FJ998211.1	H1N1
2	A/México/LaGloria-3/2009 (H1N1)	PB2:CY077592.1 PA: CY077594.1 NP: CY077596.1 M: CY077598.1	H1N1
3	A/México City/005/2009(H1N1)	PB2: CY050886 PA: CY050884 NP: CY050882 M: CY050880	H1N1

Los alineamientos de las secuencias completas de cada uno de los genes, fueron llevados a cabo usando un alineamiento progresivo a través de

MAFFT V.7 (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences) [Kazutaka *et al.*, 2002] evaluando el alineamiento con el mejor “score”. Para caracterizar la historia filogenética, se aplicó el método estadístico bajo los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) mediante un análisis JModelTest [Posadas 2008], para cada set de secuencias y así, determinar el mejor modelo de sustitución utilizando principalmente los criterios de información BIC (Bayesian Information Criterion), que se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Modelos de evolución para inferencia filogenética por JModelTest.

GEN	MODELO BIC
PB2	Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) + Gamma Distributed (G)
PA	General Time Reversible (GTR) + Gamma Distributed (G)
NP	Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) + Gamma Distributed (G)
M	Kimura 2-parameter (K2) + Gamma Distributed (G)

Se aplicó un test filogenético bootstrap de 1000 replicas, para proporcionar el soporte del valor estadístico de cada rama generada. Sólo los valores bootstrap ≥ 0.80 (80%) [Felsenstein 1985], se tomaron en cuenta como valores significativos.

Se utilizó el software bioinformático, Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA V.5.2.1[®] [Tamura *et al.*, 2011] para la caracterización y construcción de los árboles filogenéticos a partir de las secuencias de nucleótidos y del criterio Bayesiano (BIC), además, de la terminal RaxML GUI (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) [Stamatakis 2006] para aquellos genes modelados con GTR donde las filogenias obtenidas fueron visualizadas y analizadas con FigTree V.1.4.0 [Rambaut 2009] con *midpoint*

rooting. Los árboles se mostrarán a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se encuentran en unidades de número de sustituciones de base por sitio. Con la finalidad de observar diferencias evolutivas y el linaje.

Las Transiciones (Ti) y las Transversiones (Tr) fueron computarizadas con MEGA V.5.2.1[®] [Kumar *et al.*, 2004]. Los sitios polimórficos (Polimorfismo de Nucleótido Simple, (SNP)), InDel (Inserciones-Delesiones) así como las sustituciones sinónimas y no sinónimas fueron calculadas con DnaSP 5.10 [Rozas *et al.*, 2003].

6. RESULTADOS

De manera general se optimizó y estandarizó la técnica de RT-PCR y M-RT-PCR, como se indicó en la metodología con procesos de gradientes de temperatura para la alineación de los oligonucleótidos, para posteriormente obtener la concentración mínima de RNA capaz de ser detectada por la PCR en los virus de referencia.

6.1 AMPLIFICACIÓN DE LA RT-PCR.

Para el virus A/swine/New Jersey/11/76(H1N1) la concentración de RNA mínima detectada fue de 12.82 ng/μl mientras que para el virus A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2) fue de 11.58 ng/μl. La alineación de los oligonucleótidos óptima en ambos virus, en los gradientes de temperatura se encontró a 56°C. De tal manera que el protocolo de tiempos y temperaturas se montó de la siguiente forma en la imagen 5.

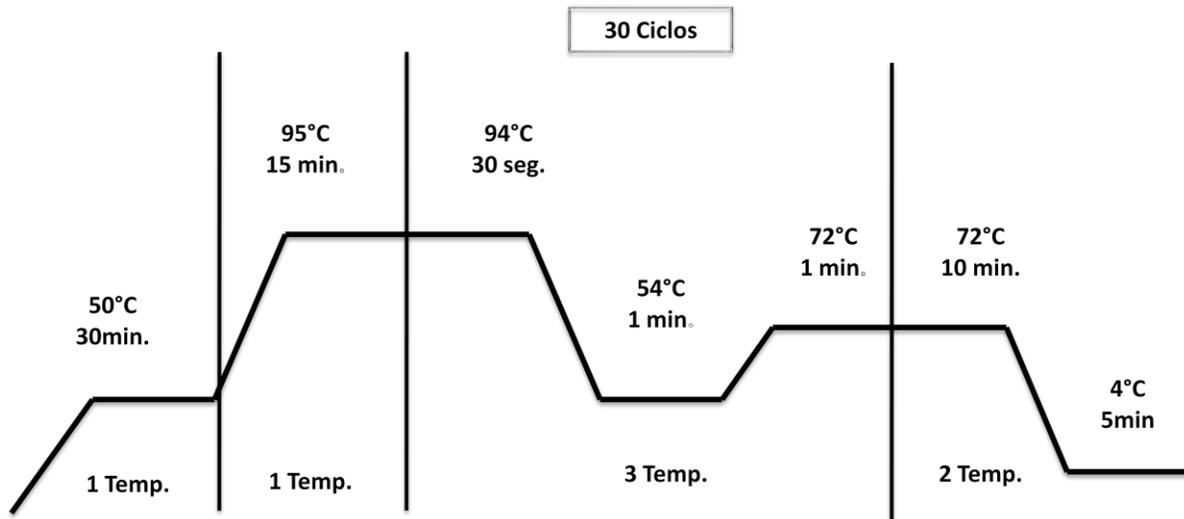


Imagen 5. Condiciones óptimas establecidas para la RT-PCR del virus de influenza.

RESULTADOS

Se logró amplificar los segmentos genómicos de los cuatro genes de estudio para los virus de referencia H1N1 y H3N2 determinados por los sets de oligonucleótidos diseñados. Ver imagen 6 y 7. Los segmentos genómicos de los genes PB2, NP y M fueron identificados en los siete aislamientos virales de forma adecuada (Imagen 6 y 7), sin embargo se logra observar un fragmento de amplificación con diferente tamaño al establecido en el diseño de los oligonucleótidos para la identificación del gen PA, con un peso molecular de aproximadamente 300pb. Ver imagen 6.

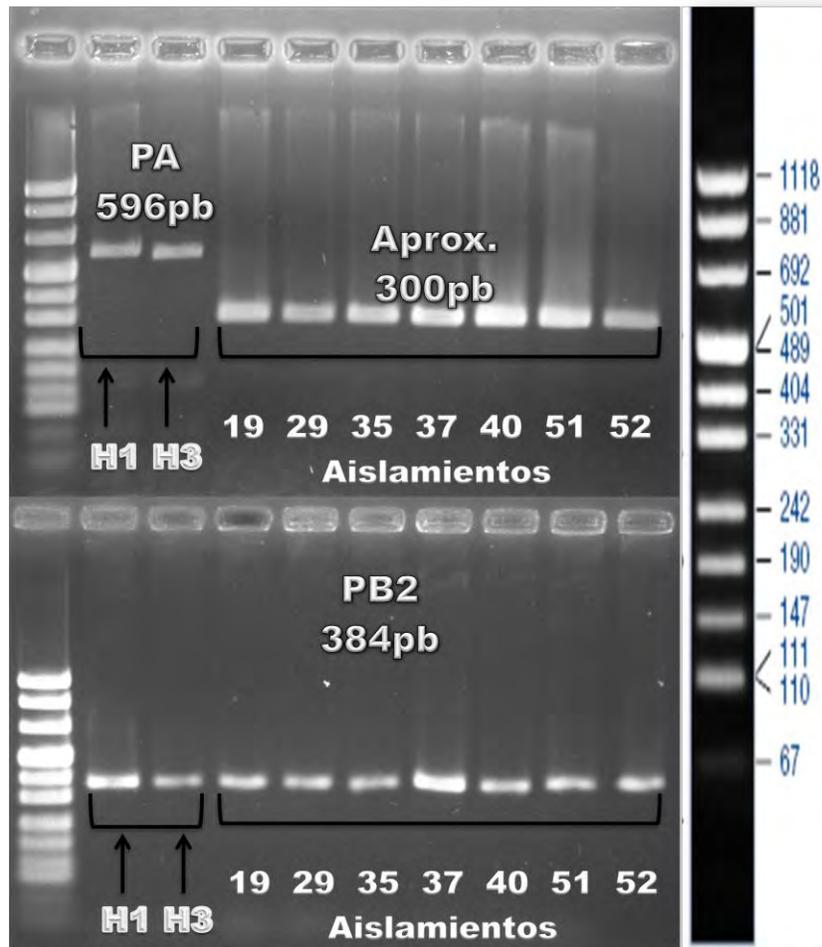


Imagen 6. Producto de amplificación de la RT-PCR para los genes PA y PB2 de los virus de referencia y los aislados virales de interés. Gel de agarosa al 3%.

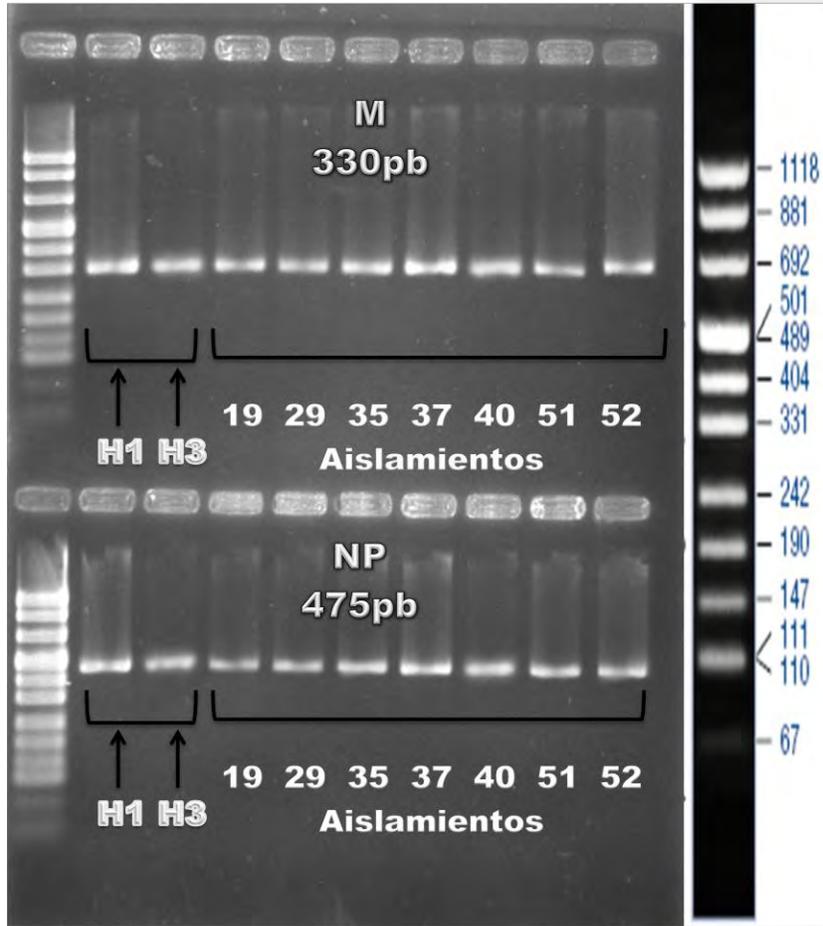


Imagen 7. Producto de amplificación de la RT-PCR para los genes M y NP de los virus de referencia y los aislados virales de interés.
Gel de agarosa al 3%.

6.2 AMPLIFICACIÓN DE LA M-RT-PCR

Con esta variante de RT-PCR Multisegmentos del protocolo estandarizado por Zhou y colaboradores 2009, se amplificaron en los controles de referencia H1N1 y H3N2, por medio del método de extracción utilizando el Trizol[®] Reagent cuatro genes completos: NS (0.9Kb), M (1Kb), NA (1.4Kb) y NP (1.6Kb), mientras que, a través del método extracción realizado con el

RESULTADOS

kit comercial PureLink™ Viral RNA/DNA se lograron amplificar 5 genes completos, además de los cuatro anteriores, el gen HA (1.8Kb). Imagen 8.

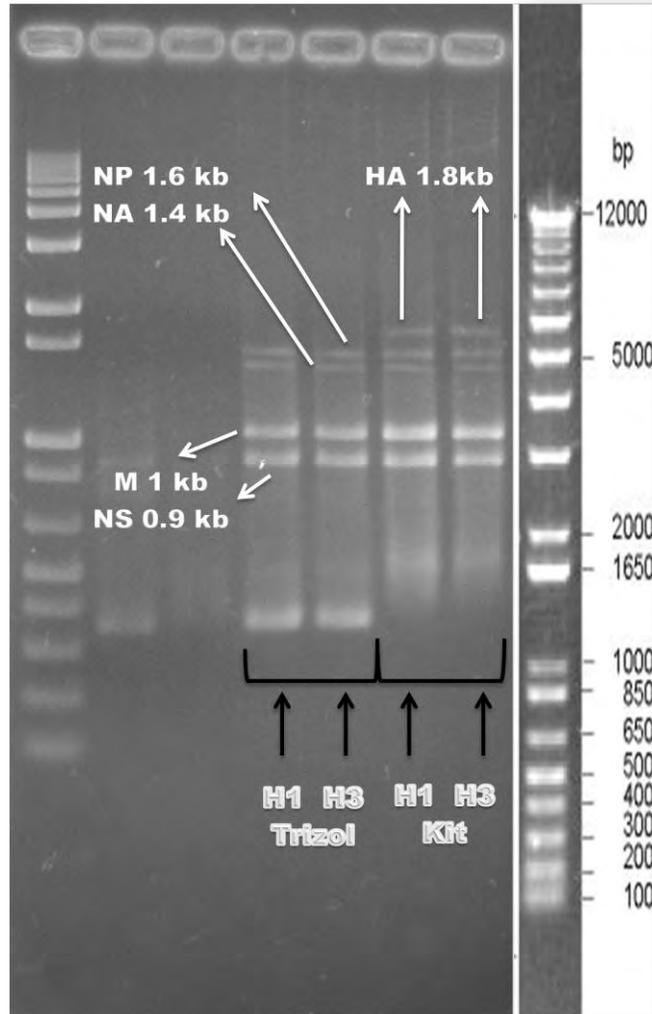


Imagen 8. *Productos de amplificación para los controles de referencia con la M-RT-PCR para la identificación del genoma completo. Gel de agarosa al 2%. Tiempo: 2.5 hrs. Voltaje: 70V.*

Para la identificación de genes completos en los siete aislamientos virales, se logra observar que únicamente dos genes NS (0.9Kb) y M (1Kb) amplificaron y se observan en la imagen 9.

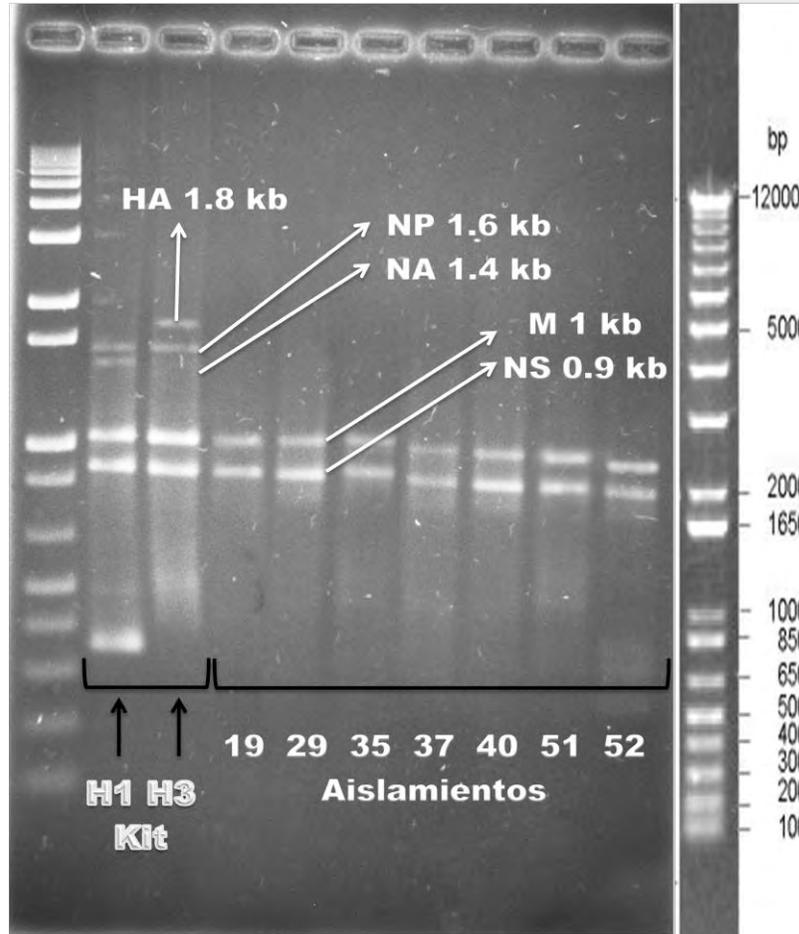


Imagen 9. *Productos de amplificación para los aislamientos virales con la M-RT-PCR para la identificación del genoma completo. Gel de agarosa al 2%. Tiempo: 2.5 hrs. Voltaje: 70V*

6.3 SECUENCIACIÓN

Debido a las circunstancias enfrentadas durante el desarrollo de la técnica de M-RT-PCR, al no poder amplificar de manera eficiente los segmentos de interés, con el fin de obtener a mayor velocidad las secuencias de estos genes, se enviaron los virus directamente al IBT. Con la secuenciación genómica, se obtuvieron las secuencias completas de los genes de interés para los siete aislados virales, las cuales se encuentran disponibles con su

RESULTADOS

número de acceso en la base de datos del NCBI. Se muestran a continuación en el cuadro 10.

Cuadro 10. *Número de Acceso GenBank – NCBI para los cuatro genes internos de los aislados de influenza porcina.*

Aislamiento	Nomenclatura	Acceso GenBank
1	A/swine/México/Mex19/2010(H1N1)	PB2: CY122330 PA: CY122332 NP: CY122334 M: CY122336
2	A/swine/México/Ver29/2010(H1N1)	PB2: CY122386 PA: CY122388 NP: CY122390 M: CY122392
3	A/swine/México/Qro35/2010(H1N1)	PB2: CY122378 PA: CY122380.1 NP: CY122382 M: CY122384
4	A/swine/México/Ver37/2010(H1N1))	PB2: CY122401 PA: CY122403 NP: CY122405 M: CY122407
5	A/swine/México/Mich40/2010(H3N2)	PB2: CY122362 PA: CY122364 NP: CY122366 M: CY122368
6	A/swine/México/Mex51/2010(H3N2)	PB2: CY122346 PA: CY122348 NP: CY122350 M: CY122352
7	A/swine/México/Mex52/2010(H1N1)	PB2: CY122354 PA: CY122356 NP: CY122358 M: CY122360

6.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

6.4.1 Caracterización Filogenética de los genes internos PB2, PA, NP y M.

A continuación se describen las filogenias realizadas a través de modelos con el BIC.

Los virus pandémicos en el esquema evolutivo de la reconstrucción de filogenias para los genes PB2, NP y M, se encuentran agrupados en clusters totalmente diferentes a la evolución constante de todos los virus porcinos incluidos en el análisis; sin embargo, el gen PA de estos virus pandémicos corresponden a un arquetipo en común de origen aviar que divergió en la especie porcina para mantenerse en una línea de evolución continua. Se muestran en las imágenes 10 y 13.

6.4.1.1 Caracterización filogenética del Gen NP.

Se realizó la caracterización filogenética del gen NP (segmento 5), debido a que es el principal componente viral que determina la especificidad de especie [Scholtissek *et al.*, 1985]. Los altos niveles de homología durante el análisis BLASTn (98-100%) y BLASTp (98-100%), identificaron una relación estrecha con virus porcinos. Se denota un clúster de los siete aislamientos en un grupo monofilético. Además se observa que los aislamientos 40 y 51 (H3N2) tienen una rama evolutiva diferente como genes ortólogos con respecto a los otros virus, con una relación ancestral a un virus A/swine/Minnesota/1192/2001(H1N2), mientras que los aislados 19, 29, 35, 37 y 52 (H1N1) con un virus A/swine/Wisconsin/H02AS8/2002(H3N2). Ver imagen 10.

RESULTADOS

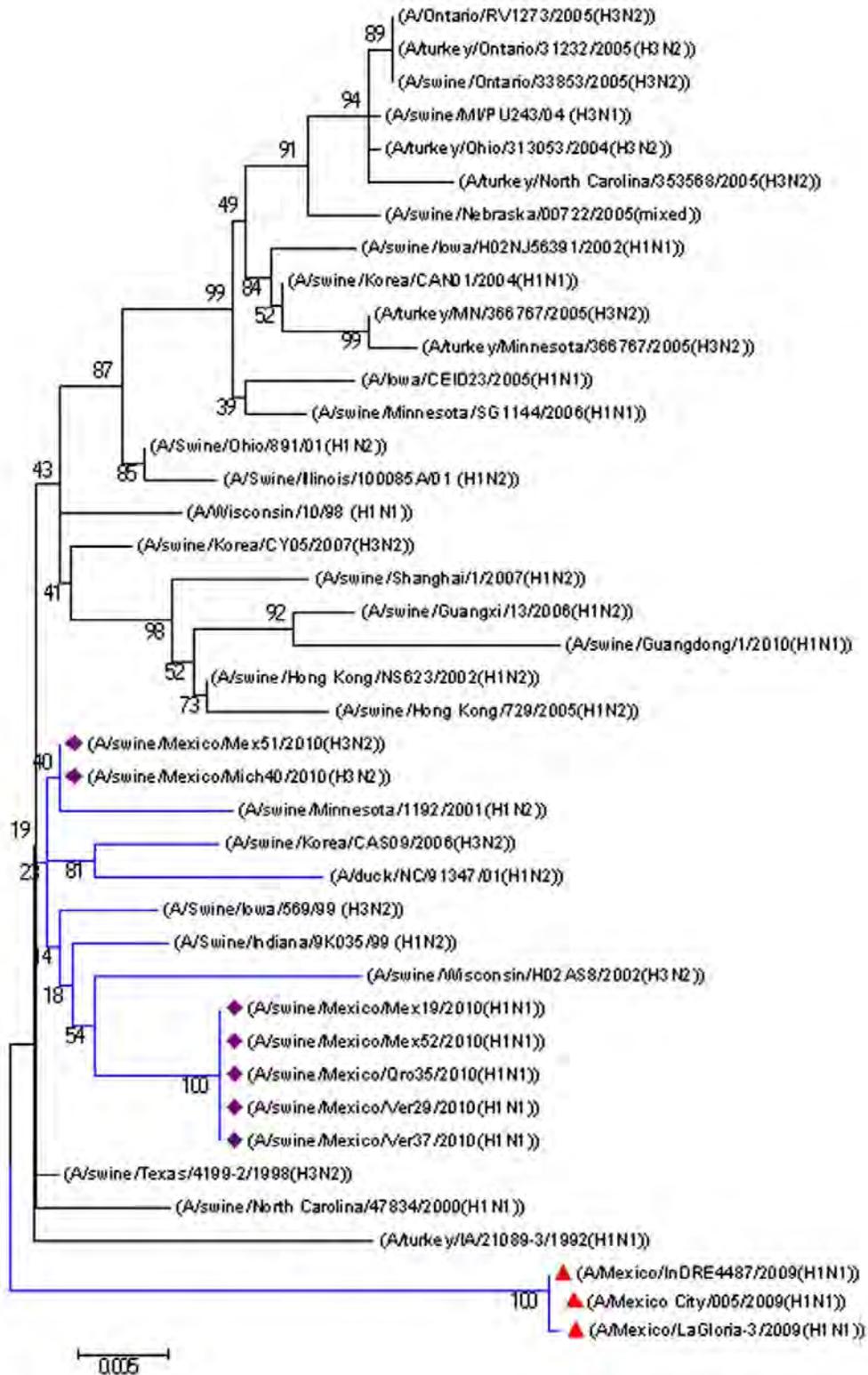


Imagen 10. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de sustitución HKY + G. Árbol filogenético para el *gen NP* de los siete aislamientos virales (diamante violeta) y de los virus pandémicos (triángulo rojo) basado en secuencias de nucleótidos y otras secuencias disponibles en el Genbank. Se analizaron 40 secuencias de nucleótidos.

Se encontraron tres cambios amínicos totales y únicos, en el gen NP referentes a las secuencias pandémicas en comparación con los aislados virales. La posición T3 de las secuencias virales de los aislamientos porcinos, comparte lo mismo con *A/swine/Minnesota/1192/2001(H1N2)* y *A/swine/Wisconsin/H02AS8/2002(H3N2)*. En el virus 40 y 51, así como los virus 19, 29, 35, 37 y 52, poseen un cambio único en las posiciones D101N y V425I respectivamente, sin embargo en la posición 217 presentan los respectivos I217 y T217, además de que en las secuencias pandémicas se tiene V217. Ver cuadro 11.

6.4.1.2 Caracterización filogenética del Gen PB2.

Con respecto al gen PB2 (segmento 1), los virus se encuentran agrupados dentro en un cluster de genes virales de origen porcino, a través de una divergencia evolutiva entre aves y cerdos, y que mantienen una relación filogenética con el virus *A/swine/Minnesota/1192/2001(H1N2)*. Los aislados 29, 35, 37 y 52 (H1N1), así como los 19 (H1N1), 40 y 51 (H3N2), divergen del mismo arquetipo bajo diferentes líneas de evolución siendo genes parálogos. Existe una homología sinapomórfica entre los virus 19, 40 y 51 siendo subtipos virales diferentes. Ver imagen 11.

RESULTADOS

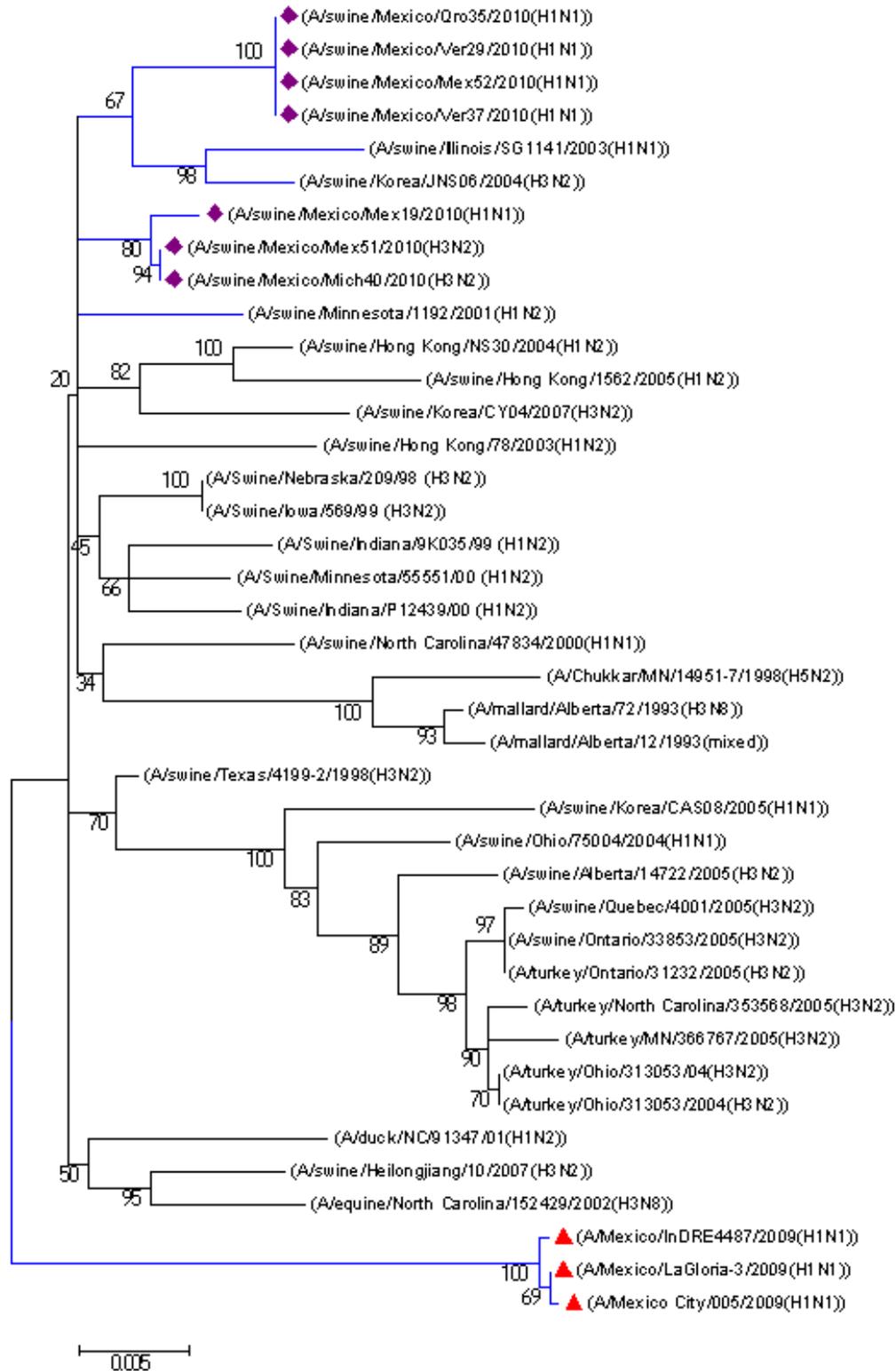


Imagen 11. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de sustitución HKY + G. Arbol filogenético para el gen PB2 de los siete aislamientos virales (diamante violeta) y de los virus pandémicos (triangulo rojo) basado en secuencias de nucleótidos y otras secuencias disponibles en el Genbank. Se analizaron 40 secuencias de nucleótidos.

Se encontraron seis cambios amínicos totales en el gen PB2 que son propios de los virus pandémicos en comparación de todas las secuencias. En las secuencias de los virus 29, 35, 37 y 52 se encontraron 4 cambios amínicos en las posiciones I292M, V386A, L434F y V731I, dos de estos son cambios que solo tienen estos virus con respecto a todas las secuencias alineadas incluyendo los virus pandémicos, además, en la posición 292 coincide con los virus *A/swine/Illinois/SG1141/2003(H1N1)* y *A/swine/Korea/JNS06/2004(H3N2)*, mientras que en la posición 731 el aminoácido respectivo está presente en los virus anteriores además del virus *A/swine/Minnesota/1192/2001(H1N2)*. Por otra parte, los virus 19, 40 y 51 también tienen cuatro cambios de aminoácidos únicos (que no presentaba ninguna otra secuencia) en las posiciones A395V, I451T, L475M y T637A. Ver cuadro 11.

6.4.1.3 Caracterización filogenética del Gen PA.

La relación filogenética del gen PA (segmento 3), del virus *A/swine/México/Qro35/2010(H1N1)* es un gen parálogo con respecto a los demás y posee una cercanía con los virus de influenza humana. Nos permite identificar claramente una rama evolutiva heterogénea en un grupo monofilético homoplásico con una relación convergente muy estrecha con secuencias virales de genes de origen humano del subtipo H3N2 (valor de soporte estadístico bootstrap del 100%). Las demás secuencias del gen PA de los aislamientos virales trabajados, mantienen una relación evolutiva que proviene directamente del *A/swine/Minnesota/1192/2001(H1N2)* relacionado de forma recurrente. Los genes de los aislamientos 40 y 51 (H3N2) poseen

RESULTADOS

una homología sinapomórfica y se encuentran en un cluster dividido en genes de cerdo y ave por un arquetipo común. Por otro lado, divergen genéticamente con los genes de los aislamientos 19, 29, 37 y 52 (H1N1). Ambos grupos en clusters que presentan una relación cercana con virus americanos de diferentes regiones. Ver imagen 12.

RESULTADOS

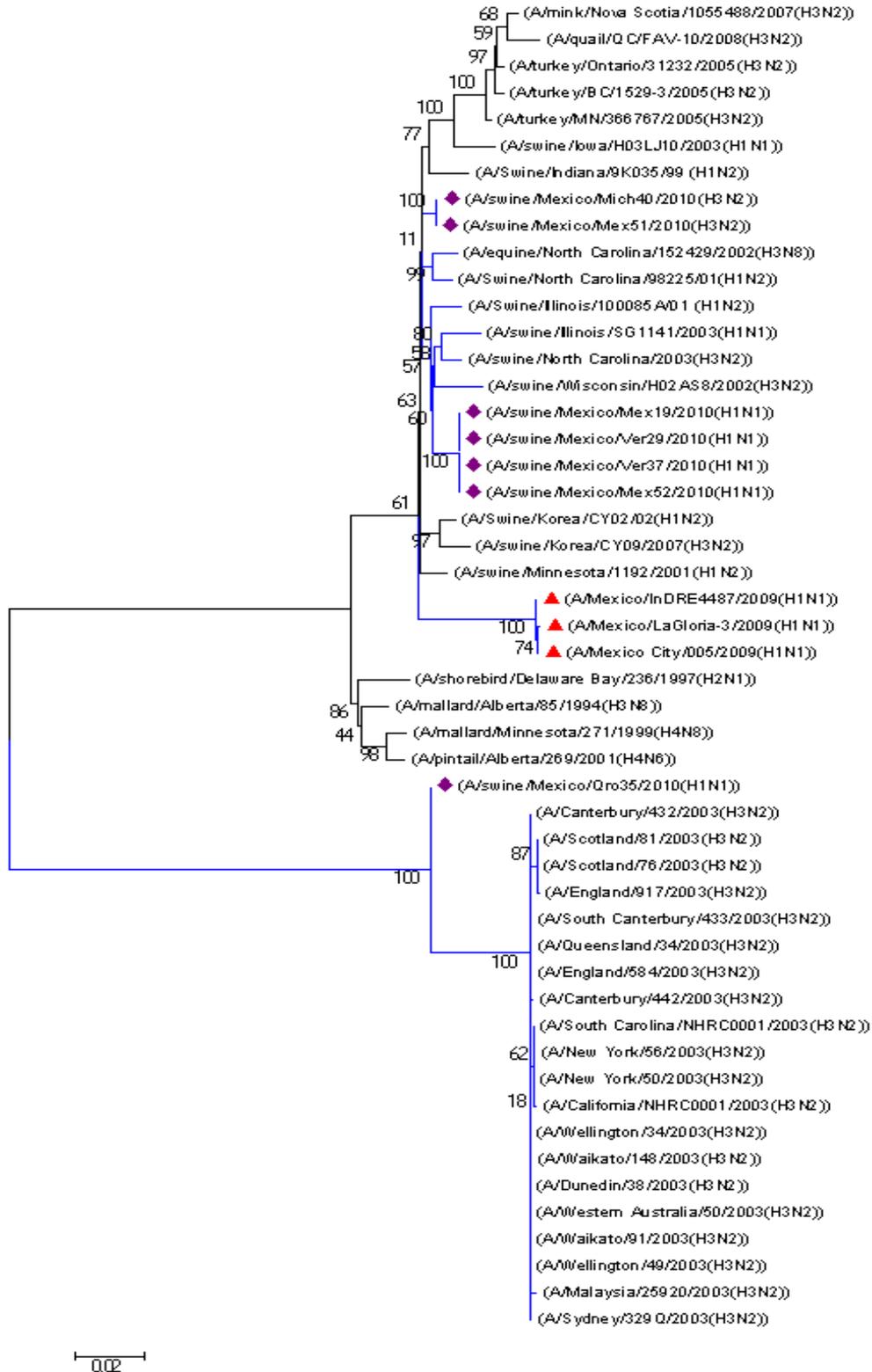


Imagen 12. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de sustitución GTR + G. Árbol filogenético para el **gen PA** de los siete aislamientos virales (diamante violeta) y de los virus pandémicos (triángulo rojo) basado en secuencias de nucleótidos y otras secuencias disponibles en el Genbank. Se analizaron 50 secuencias de nucleótidos.

En este gen existen seis cambios de aminoácidos que solo son detectados en secuencias pandémicas. Se identificaron 33 cambios amínicos en el virus A/swine/México/Qro35/2010(H1N1) que corresponde a las secuencias virales humanas en su totalidad. Respecto a este virus 35, se localizaron tres aminoácidos N254, R262 y R356 que coinciden con los virus pandémicos y humanos. Además, de dos aminoácidos que únicamente este virus y el virus A/Malaysia/25920/2003(H3N2) poseen: S259 y V459.

La posición en el aminoácido L403I corresponde solo en los aislados 40 y 51, mientras que el R551K para los aislados 19, 29, 35, 37 y 52. Los aislados virales 19, 29, 37 y 52 poseen un cambio amínico de Q344 diferente a las secuencias 35, 40 y 51 (L344). Las secuencias virales 19, 29, 35, 37 y 52 con el aminoácido V592 corresponden también a las secuencias virales A/swine/Illinois/SG1141/2003(H1N1) y A/swine/Wisconsin/H02AS8/2002(H3N2). Ver cuadro 11.

6.4.1.4 Caracterización filogenética del Gen M.

De manera general, filogenéticamente son genes parálogos que divergen de un ancestro no soportado por el valor de la filogenia, de los cuales los aislamientos 40 y 51 (H3N2) se encuentran relacionados con virus porcinos y muy cercanamente con un virus americano A/swine/Nebraska/209/98(H3N2), mientras que los demás aislados 19, 29, 37 y 52 (H1N1) con un virus asiático A/swine/Korea/CAS05/2004(H3N2), con 98 y 97% de soporte bootstrap respectivamente. Ver imagen 13.

RESULTADOS

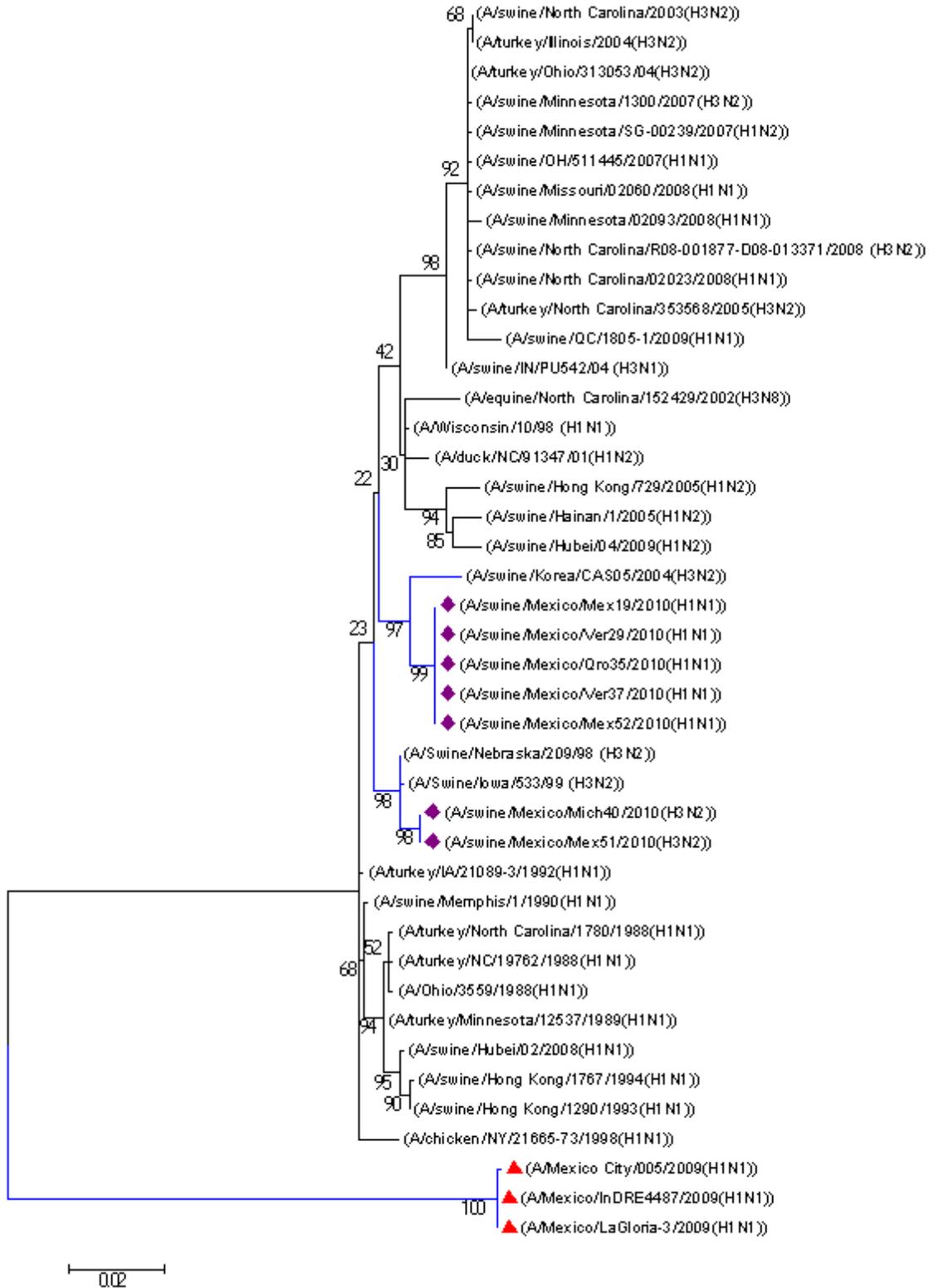


Imagen 13. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de sustitución $K2 + G$. Árbol filogenético para el **gen M** de los siete aislamientos virales (diamante violeta) y de los virus pandémicos (triángulo rojo) basado en secuencias de nucleótidos y otras secuencias disponibles en el Genbank. Se analizaron 42 secuencias de nucleótidos.

RESULTADOS

Se observaron 21 cambios amínicos totales en el gen M que pertenecen a virus pandémicos propiamente en comparación de todas las secuencias. En la subunidad M1, la posición en el aminoácido A239T corresponde solo en los aislados 40 y 51, mientras que el V205I para los aislados 19, 29, 35, 37 y 52. Para la subunidad M2 en la posición C54 coincide con los virus 19, 29, 35, 37, 52 y A/swine/Korea/CAS05/2004(H3N2). La posición en el aminoácido E479 corresponde solo en los aislados 40, 51 y secuencias pandémicas, mientras que el K79 para los aislados 19, 29, 35, 37 y 52. Ver cuadro 11.

Los cambios amínicos identificados durante el alineamiento múltiple de secuencias, toma como referencia a la nomenclatura estándar por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry).

RESULTADOS

Cuadro 11. Comparación de residuos de aminoácidos para los genes PB2, PA, NP y M en los siete asilamientos virales, confrontados con secuencias virales pandémicas y otras secuencias disponibles en el Genbank.

VIRUS	GENES INTERNOS																								
	PB2								PA								NP				M1		M2		
	292	386	395	434	451	475	637	731	254	259	262	336	356	403	459	551	592	3	101	217	425	205	239	54	79
A/swine/México/Mex19/2010(H1N1)	I	V	V	L	T	M	A	I	S	P	K	Q	K	L	I	K	V	T	D	T	I	I	A	C	K
A/swine/México/Ver29/2010(H1N1)	M	A	A	F	I	L	T	I	S	P	K	Q	K	L	I	K	V	T	D	T	I	I	A	C	K
A/swine/México/Qro35/2010(H1N1)	M	A	A	F	I	L	T	I	N	S	R	L	R	L	V	R	V	T	D	T	I	I	A	C	K
A/swine/México/Ver37/2010(H1N1)	M	A	A	F	I	L	T	I	S	P	K	Q	K	L	I	K	V	T	D	T	I	I	A	C	K
A/swine/México/Mich40/2010(H3N2)	I	V	V	L	T	M	A	V	S	P	K	L	K	I	I	R	I	T	N	I	V	V	T	R	E
A/swine/México/Mex51/2010(H3N2)	I	V	V	L	T	M	A	V	S	P	K	L	K	I	I	R	I	T	N	I	V	V	T	R	E
A/swine/México/Mex52/2010(H1N1)	M	A	A	F	I	L	T	I	S	P	K	Q	K	L	I	K	V	T	D	T	I	I	A	C	K
Pandémicos	V	V	A	L	I	L	T	V	N ^{ab}	P	R ^a	M	R ^a	L	I	R	I	S	D	V	V	V	A	R	E
A/swine/Minnesota/1192/2001(H1N2)	I	V	A	L	I	L	T	V	S	P	K	L	K	L	I	R	I	T	D	I	V	-	-	-	-
A/swine/Wisconsin/H02AS8/2002(H3N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	S	P	K	L	K	L	I	R	V	T	D	T	V	-	-	-	-
A/swine/Korea/JNS06/2004(H3N2)	M	V	A	L	I	L	T	I	N	P	K	L	K	L	I	R	I	-	-	-	-	-	-	-	-
A/swine/Illinois/SG1141/2003(H1N1)	M	V	A	L	I	L	T	I	N	P	K	L	K	L	I	R	V	-	-	-	-	-	-	-	-
A/Malaysia/25920/2003(H3N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	N	S	R	L	R	L	V	R	I	-	-	-	-	-	-	-	-
A/Swine/Iowa/533/99 (H3N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	T	-	-
A/Swine/Nebraska/209/98 (H3N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	T	-	-
A/swine/Korea/CAS05/2004(H3N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	A	C	K
Otras secuencias	I	V	A	L	I	L	T	V	S	P	K	L	K	L	I	R	I	S	D	I	V	V	A	R	K

⁻ Secuencias fuera del análisis

^a Virus Humanos

^b Virus Aviares

6.4.2 Frecuencia mutagénica de los aislados virales respecto al virus de referencia A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2).

(NOTA: Estos análisis se limitaron al virus de referencia H3N2, debido a que en el Gen Bank no se cuenta con las secuencias competentes a los genes de estudio para el virus de referencia H1N1.)

El porcentaje de similitud entre secuencias, realizado con un alineamiento global a partir del fragmento parcial del el virus de referencia H3N2, reportado en el Gen Bank, se observan en el cuadro 13. El porcentaje de similitud más bajo lo denota el virus A/swine/México/Qro35/2010(H1N1) en el gen PA con 84%, seguido del virus A/swine/México/Mex19/2010(H1N1) en el gen PB2 con 95%. La similitud de los demás virus se encuentra entre 98 y 99%.

Cuadro 12. *Relación porcentual de similitud de las secuencias virales a partir del virus de referencia H3N2 (A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2)).*

VIRUS	GENES			
	PB2	PA	NP	M
A/swine/México/Mich40/2010(H3N2)	98	98	99	99
A/swine/México/Mex51/2010(H3N2)	98	98	99	99
A/swine/México/Mex19/2010(H1N1)	95	98	98	98
A/swine/México/Ver29/2010(H1N1)	98	98	98	98
A/swine/México/Qro35/2010(H1N1)	98	84	98	98
A/swine/México/Ver37/2010(H1N1))	98	98	98	98
A/swine/México/Mex52/2010(H1N1)	98	98	98	98

La estimación del sesgo por ML para las transiciones / transversiones se muestra a continuación en el cuadro 14. El valor con mayor razón pertenece al gen PB2 y el menor al gen NP, con 22.60 y 3.15 transiciones por cada transversión respectivamente.

RESULTADOS

Cuadro 13 Patrón de relación T_i / T_r bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por ML.

GEN	RAZÓN O SESGO
PB2	22.60
PA	4.39
NP	3.15
M	4.53

La probabilidad de sustitución estimada por ML de una transición o transversión para cada gen, se muestran en los cuadros 15 al 18. El gen PB2 muestra menor probabilidad de presentar transversiones que los genes PA, NP y M. Las probabilidades en las transiciones de los cuatro genes, marcan una tendencia mas elevada en su presentación.

Cuadro 14 Probabilidad estimada de T_i o T_r para el GEN PB2, bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por ML.

	A	T/U	C	G
A	-	0.26	0.97	26.29
T/U	0.43	-	17.09	0.33
C	1.73	18.14	-	0.33
G	33.94	0.26	0.24	-

Cuadro 15 Probabilidad estimada de T_i o T_r para el GEN PA, bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por ML.

	A	T/U	C	G
A	-	3.41	1.70	17.74
T/U	5.3	-	17.71	1.14
C	3.07	20.60	-	1.44
G	25.69	1.06	1.16	-

RESULTADOS

Cuadro 16 Probabilidad estimada de T_i o T_r para el GEN NP, bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por ML.

	A	T/U	C	G
A	-	3.13	3.16	12.72
T/U	5.13	-	22.33	1.77
C	5.67	24.76	-	1.77
G	16.78	1.44	1.30	-

Cuadro 17 Probabilidad estimada de T_i o T_r para el GEN M, bajo el modelo General Time Reversible (GTR+G+I) por ML.

	A	T/U	C	G
A	-	1.88	3.77	17.23
T/U	2.45	-	22.30	1.26
C	4.93	22.40	-	1.26
G	20.27	1.14	1.13	-

RESULTADOS

A continuación, en el cuadro 19, se muestran los cambios amínicos en los aislados virales respecto al virus de referencia H3N2.

Cuadro 18. Comparación de residuos de aminoácidos para los genes PB2, PA, NP y M en los siete asilamientos virales, tomando como referencia al virus A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2).

VIRUS	GENES INTERNOS																												
	PB2							PA							NP			M											
	46	301	395	404	428	460	484	35	36	63	65	68	70	73	74	108	150	192	18	116	232	23	213	247	342	287	291	292	342
A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2)	R	I	V	A	L	I	L	D	P	D	R	A	I	S	G	V	E	S	S	D	I	I	V	T	R	I	S	L	S
A/swine/México/Mich40/2010(H3N2)	-	-	-	V	-	T	M	-	-	-	-	S	-	-	-	-	K	-	T	N	-	V	-	-	-	-	-	F	-
A/swine/México/Mex51/2010(H3N2)	-	-	-	V	-	T	M	-	-	-	-	S	-	-	-	-	K	-	T	N	-	V	-	-	-	-	-	F	-
A/swine/México/Mex19/2010(H1N1)	-	-	-	V	-	T	M	-	-	-	-	S	-	-	-	-	K	-	T	-	T	V	I	A	S	M	L	-	G
A/swine/México/Ver29/2010(H1N1)	G	M	A	-	F	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	K	-	T	-	T	V	I	A	S	M	L	-	G
A/swine/México/Qro35/2010(H1N1)	G	M	A	-	F	-	-	N	L	N	Q	S	V	L	D	A	K	N	T	-	T	V	I	A	S	M	L	-	G
A/swine/México/Ver37/2010(H1N1))	G	M	A	-	F	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	K	-	T	-	T	V	I	A	S	M	L	-	G
A/swine/México/Mex52/2010(H1N1)	G	M	A	-	F	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	K	-	T	-	T	V	I	A	S	M	L	-	G

Las mutaciones implicadas en el cambio del marco de lectura para la codificación de aminoácidos se muestran en el cuadro 20. En el gen PB2 muestra mayor número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, mientras que el gen NP con menor número de mutaciones.

Cuadro 19. Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas para los genes PB2, PA, NP y M en los siete asilamientos virales, tomando como referencia al virus A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2)

GEN	MUTACIONES SINÓNIMAS	MUTACIONES NO SINÓNIMAS
PB2	26	7
PA	81	17
NP	8	3
M	14	8
TOTAL	129	35

No se computarizaron InDels

7. DISCUSIÓN

La pandemia por el virus A/H1N1, demostró la velocidad con la que el virus se puede diseminar entre la población e ilustra la necesidad de tecnologías que permitan el análisis de secuencia de alto rendimiento para intervenir de manera oportuna.

El esquema táctico de la técnica M-RT-PCR [Zhou *et al.*, 2009], para la amplificación del genoma completo y la cual utilizamos en este estudio para generar los segmentos genómicos completos, toma como ventaja las características moleculares de los virus de influenza durante la fase de replicación, ya que las regiones extremas no codificantes 3' y 5' contienen secuencias conservadas de 12 y 13 nucleótidos respectivamente, sobre la cual diseñaron los oligonucleótidos para así, amplificar de manera efectiva el genoma completo de los virus de influenza que circularon en años pasados y contemporáneos independientemente del linaje y genotipo por medio de “primers universales”. Sin embargo, en este estudio no se lograron amplificar los ocho segmentos completos utilizando las mismas condiciones del protocolo con tiempos y temperaturas. La finalidad de utilizar esta técnica, pretendía obtener de manera directa los segmentos virales involucrados dentro del estudio para facilitar su posterior purificación, PCR de secuencia y secuenciación. Los fragmentos más pesados que corresponden a los del complejo de la polimerasa PB2, PB1 y PA no se lograron obtener dentro de los virus de referencia, mientras que para los aislamientos virales solo se obtuvieron los segmentos con menor peso molecular M y NS.

Algunos grupos de investigación en años anteriores, han utilizado estas regiones para obtener secuencias completas de los genes de influenza, sin

embargo, las regiones conservadas no deberían utilizarse como promotores para la síntesis de oligonucleótidos, debido a que estas son parcialmente “complementarias” y “conservadas” ya que existen cambios de base dentro de la secuencia de la región no codificante.

De este modo, se presentan una serie de trabajos donde los factores determinantes, de acuerdo a cada autor, radican en la estandarización del protocolo, específicamente: en la secuencia exacta y especificidad de oligonucleótidos, tamaño, número de ciclos, temperatura de alineación, características de la enzima utilizada y por supuesto concentraciones de los reactivos. Estos trabajos utilizan enzimas clásicas de transcriptasa reversa (RT) como: Virus de la Leucemia Murina de Moloney (M-MLV) y la enzima del Virus de la Mieloblastosis Aviar (óptimas a 37-42°C), ambas de Promega, y la ThermoScript™ RT de Invitrogen® (óptima a partir de 75°C), lo que implica hacer reacciones de RT-PCR en pasos utilizando DNA polimerasa de Fermentas®. En este estudio realizado utilizamos la SuperScript™ One-Step RT-PCR con Platinum® Taq de Invitrogen® (óptima a partir de 55°C)

Por lo anterior, se ha demostrado la amplificación de los ocho segmentos de virus de influenza sin importar el linaje, por medio de un set universal de primers que difieren dos o tres residuos en su extremo 3' y que le confiere la especificidad de cada uno de los genes del virus [Hoffman *et al.*, 2001]. A diferencia de nuestro estudio, que muestra un único set de oligonucleótidos en una simple reacción de PCR. También se ha realizado el mismo método pero de tipo múltiplex como el utilizado en este estudio, obteniendo buenos resultados [Adeyefa *et al.*, 1994].

Posteriormente, se modificaron los oligonucleótidos descritos por Hoffman y colaboradores. El Primer Uni-12 altamente conservado a reserva de una base en la cuarta posición, la cual varía de A o G, situación que mejoró diseñando un primer degenerado colocando una R en dicha posición [Chi-Ho Chan *et al.*, 2006]. También maneja protocolos diferentes para amplificar segmentos pesados (PB2, PB1 y PA) y ligeros (HA, NP, NA, M y NS), así como el tamaño de la secuencia de primers en reacciones individuales de RT-PCR. Obtienen mejores resultados usando la enzima ThermoScript™ RT que la M-MLV. Por parte de lo realizado en este estudio, los oligonucleótidos diseñados no toman en cuenta esta característica molecular dentro de la secuencia y la longitud. La alineación de los oligonucleótidos, se considera como un paso crítico para generar los fragmentos más pesados, por lo tanto, para incrementar la eficiencia y estabilizar la unión de los oligos es conveniente aumentar su tamaño, así como su temperatura de alineación [Adeyefa *et al.*, 1994].

Otros estudios se han enfocado en la amplificación del genoma completo del virus de Influenza equina tipo 2 (H3N8) [Sguazza *et al.*, 2009]. Se denota una diferencia relevante en el protocolo que utilizamos en este estudio realizado en un solo paso, debido a que ellos manejan una serie de mejoras a través de varios pasos dentro de su protocolo, para generar una cadena de DNA simple y doble de manera indistinta, las cuales usan como templados de PCR posteriormente. Algunas variaciones encontradas durante la amplificación radican en el tiempo y la temperatura de alineación de 17 grados menos que la nuestra de 57°C. Situación probablemente debida a que los oligonucleótidos empleados en este estudio contienen un mayor número de bases respecto a los utilizados por Sguazza y colaboradores. Lo anterior, podría ser factor para

la falta de amplicones generados debido al escaso tiempo y estabilidad de los oligonucleótidos. En este estudio, la RT-PCR fue realizada para obtener los ocho segmentos completos en una sola reacción.

Este método múltiplex, permite identificar al virus de influenza propiamente cuando se ésta generando un riesgo en el momento; para posteriores ensayos de secuenciación, establecimiento de bibliotecas genómicas o generación de vacunas recombinantes, evitando el tiempo que requiere el aislamiento y replicación viral. Tiene como desventaja, la información parcial a nivel diagnóstico por no proporcionar el subtipo viral y por la similitud en el tamaño de los fragmentos PB1 y PB2 lo que complica la separación de los amplicones para posteriormente secuenciar.

Durante el cambio de técnica multisegmento a una convencional de RT-PCR, se consideró el diseño de oligonucleótidos específicos para poder amplificar de manera individual estos genes. La amplificación de segmentos genómicos en zonas específicas para demostrar cambios de base, se observó directamente en el gen PA de las secuencias virales que no alinearon con el peso esperado a las secuencias de referencia. Se propone lo siguiente; dadas las características de la polimerasa, esencialmente en los procesos biológicos de replicación, transcripción y en la evolución a través de su ARN proclive a errores, podrían haber generado variantes del virus, incluyendo las glicoproteínas y las propias subunidades de la polimerasa, lo que lleva a los virus que se adapten mejor a las nuevas especies huéspedes. [Stephane *et al.*, 2010; Miotto *et al.*, 2010]. Sin embargo, los múltiples aminoácidos relacionados con genes PA humanos sugeriría una desprendimiento y adaptación de este gen en la biología del virus de influenza porcina. El gen PA naturalmente se

liga fuertemente a la subunidad PB1, debido a múltiples mutaciones compensatorias generando el desprendimiento de ambas, generando variaciones genéticas en su secuencia. Es importante tomar en cuenta la evolución de estos genes que forman parte de una función importante en la virulencia [Stephane *et al.*, 2010].

Se debe considerar, que el éxito de adaptación y establecimiento interespecie del virus de influenza requiere de múltiples pasos dentro de su proceso evolutivo para llevarse a cabo de forma eficiente la replicación y transmisión. Múltiples sitios genéticos que determinan el rango de adaptación del hospedero y patogenicidad, han sido identificados en algunos estudios, por ejemplo la hemoaglutinina, que posee elementos moleculares de primera instancia durante la unión con sus receptores, sin embargo los genes internos podrían tener una participación importante en la exclusión de hospederos [Webster *et al.*, 1992].

La ausencia de una vigilancia epidemiológica sistemática y la falta de muestreos de los virus de influenza en la población porcina de México, obstaculizaron la identificación oportuna del virus pandémico A/H1N1 en el año 2009, desconociendo con exactitud como surgió de este virus con genes de origen Euroasiático y de América del Norte.

En este estudio se demostró la relación filogenética y propiedades moleculares de los genes internos de las secuencias virales de estudio, que se consideran determinantes en la gama de hospederos, tomando como base los árboles filogenéticos y la homología de la secuencia de nucleótidos de segmentos de genes reportados en el Banco Genético Mundial (GenBank).

La literatura menciona que los reordenamientos de los genes del complejo de la polimerasa, en ocasiones incluyendo al gen NP, se han involucrado en la atenuación de la virulencia o disminuyendo la habilidad para replicarse en hospederos específicos [Rott *et al.*, 1979]. En este estudio se muestra que en el gen NP de los virus pandémicos se encuentran tres cambios de aminoácidos que podrían representar la única diferencia, en este gen, con respecto al resto de los virus analizados. Bajo este mismo escenario, un estudio demostró la relación filogenética del gen NP de un virus porcino aislado de una granja en Querétaro, Méx. con respecto a dos virus de origen pandémico aislados de la “zona cero” donde se presenta la pandemia [Escalera *et al.*, 2012]. Estos virus son: A/México/LaGloria-4/2009(H1N1) y A/México/LaGloria-8/2009(H1N1), sin embargo las secuencias virales de este estudio, no contienen una nucleoproteína similar a esos virus pandémicos. El virus porcino aislado en el mismo estado A/swine/México/Qro35/2010(H1N1), presenta cambios con respecto al aislado porcino reportado por Escalera y colaboradores, donde encuentran una variación polimórfica dentro del codón el cual cambia la estructura amínica D53E de su aislado viral y que confiere dicha cercanía con virus pandémicos, situación contraria a lo encontrado en la secuencia A/swine/México/Qro35/2010(H1N1) de este estudio que no presenta ese cambio amínico, lo cual sugiere la posibilidad de un evento de transmisión viral entre el ser humano y la especie porcina, así como la circulación de variantes genéticas de virus H1N1 en cerdos. Contribuyendo a los cambios genéticos que pudieran alterar la funcionalidad del gen, se han identificado cuatro mutaciones G34A, D53E, I109T y V313I en el gen NP de un virus recombinante pandémico con un virus porcino H1N2 [Ali *et al.*, 2012]. El análisis de las

secuencias porcinas trabajadas, se identificó un cambio en la posición V313F con relación a las secuencias pandémicas. Estos cambios posiblemente estén involucrados en el reordenamiento de genes virales y con mayor presión sobre la adaptabilidad de hospederos, lo cual anteriormente ya estaba reportado [Chen y Shih 2009; Pan *et al.*, 2009] observándose el aminoácido de la posición 313, proponiendo una intervención durante la adaptación de hospederos: Y313 para humanos, F313 para aves y cerdos y V313 en los virus pandémicos.

Por otra parte, el gen M de la misma manera que el gen NP, confiere especificidad de especie [Scholtissek *et al.*, 2002], se ha reportado que los genes M de virus humanos y aviáres se pueden distinguir por varias sustituciones de aminoácidos en las subunidades proteicas tanto M1 y M2 [Buckler *et al.*, 1986]. La evidencia disponible indica que los genes M son altamente conservados pero, existe poca información sobre las relaciones evolutivas entre los genes M aislados de diferentes especies huésped [Ito *et al.*, 1991]. Las secuencias analizadas en este estudio para el gen M en la subunidad M2, no se observó la mutación S31N del virus A (H1N1) pandémico publicada por el Centro para el Control de Enfermedades durante la pandemia del 2009 [CDC 2009], nuestros virus hacen referencia en esta posición a S31. Se sabe que esta mutación confieren resistencia a los inhibidores de los canales de protones M2 (amantadina y rimantadina), solo las tres secuencias pandémicas utilizadas como referencia mantuvieron la mutación N31 (también consideradas las mutaciones en la posición 26, 27, 30, 31 y 34). Posterior a la pandemia del 2009, encontraron la misma mutación durante la caracterización genética de un virus porcino aislado en granjas de Canadá [Weingartl 2009].

Esto confirmó uno de los eventos de transmisión relevantes, el salto taxonómico del virus pandémico a cerdos. La presentación de brotes del virus pandémico A/H1N1 en cerdos y la transmisión directa de humanos a cerdos fue sugerida [Moreno *et al.*, 2010; Pereda *et al.*, 2010].

Los análisis de secuenciación, han reportado que el gen PB2 de los virus de la gripe porcina contemporánea es de origen aviar, sin embargo las secuencias porcinas mexicanas no se relacionan filogenéticamente con virus aviares, pero el aminoácido E627 aviar sí está presente. Pareciera que el aminoácido E627 no es restrictivo para el gen PB2 de origen aviar, el cual se mantiene en el linaje del virus triple reordenado porcino. Cabe mencionar que el aminoácido 627 es considerado como el principal determinante de huéspedes; K627 mamíferos incluyendo el cerdo, mientras que para E627 para aves y humanos [Hatta *et al.*, 2001; Labadie *et al.*, 2007; Subbarao *et al.*, 1993] Se ha descrito la observación de una mutación única en la posición amínica que confiere la adaptación aviar V89M la cual difiere de las secuencias reportadas en el presente estudio presentando en esta posición el aminoácido V89 [Shu *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2012]

En este estudio la evolución del gen PA del virus A/swine/México/Qro35/2010(H1N1), tiene relación filogenética con el gen PA de secuencias de virus de influenza de origen humano subtipo H3N2, lo cual indica que se están estructurando reordenamientos entre virus porcinos y humanos, que pueden llegar a tener implicaciones que aun desconocemos. Con este estudio pudimos reportar que la secuencia del gen PA con mayor distancia evolutiva en México pertenece al aislado

A/swine/México/Qro35/2010(H1N1) que presenta 33 aminoácidos idénticos a secuencias de virus de influenza humana para este gen.

El aminoácido 552 es el principal regulador de adaptación de la proteína PA [Mehle *et al.*, 2011]. a través de la medición de la actividad de la proteína PA del virus de influenza aviar y humana en modelos experimentales, señala que la mutación T552S del gen PA no es solo un potenciador de la función de la polimerasa, sino más bien de un regulador específico de la especie que superó la restricción de la polimerasa aviar en las células humanas. Con lo anterior, se sugiere que el gen PA del aislado viral y que originalmente es de origen aviar, haya recombinado y mutado para facilitar la adaptación en otra especie. Sin embargo, las secuencias pandémicas mantienen el carácter aviar T552, así como también las seis secuencias porcinas analizadas.

Los hallazgos relacionados con las mutaciones registradas en los siete aislados virales, respecto al virus de referencia A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2), ponen en evidencia la evolución constante de estos virus. Estos cambios genéticos, no solo se están dando a nivel de glicoproteínas de superficie si no también, en aquellos genes internos que aunque exista menor presión inmunológica, están involucrados en el proceso de infección, replicación y adaptación viral. Las constantes variaciones genéticas y probablemente antigénicas a nivel proteico, dependen del sitio y tipo de mutación para generar cambios dentro de su secuencia y función. A nivel de diagnóstico e independientemente de que estos genes no estén involucrados en su identificación, estas mutaciones demuestran la evolución paralela junto a los genes de la Hemoaglutinina y Neuraminidasa, pudiendo generar resultados falsos negativos.

8. CONCLUSIONES

- 1) El diseño de oligonucleótidos, es la variable más importante para determinar la sensibilidad y especificidad de los métodos basados en RT-PCR y se debe considerar para la amplificación de secuencias completas de estos virus de manera individual para posteriores análisis.
- 2) El amplicón identificado de menor tamaño al esperado en el gen PA, pudiera estar implicado en diferencias biológicas de virulencia y tropismo del virus.
- 3) Los cambios genéticos encontrados en los cuatro genes internos, proporcionaron información hacia la susceptibilidad del hospedero, para demostrar que mantienen el reordenamiento continuo con el linaje para los genes PB2 (aviar-porcino), NP (porcino) y M (porcino).
- 4) Un hallazgo importante en este estudio, es la presencia del gen PA del virus A/swine/México/Qro35/2010(H1N1), que mantiene una relación filogenética con el subtipo viral H3N2 reportado en humano. Este hallazgo podría relacionar a la especie porcina como un reservorio de genes ancestrales de origen humano.
- 5) Las mutaciones en los siete aislados tomando como referencia al virus A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2), hacen evidente la evolución genética de este virus, donde su importancia radica en las pruebas de diagnóstico en México, demostrando que este virus ha cambiado desde su aislamiento en 1998.
- 6) El monitoreo constante de nuevas cepas virales, promoverá el conocimiento del riesgo de transmisión interespecie y el control de las infecciones por el virus de influenza en la especie porcina.

9. TENDENCIAS

Si bien, en este trabajo se logró demostrar la relación filogenética de los genes internos PB2, PA, NP y M a través de posiciones genéticas, es necesario considerar esta información para posteriores estudios con implicaciones a nivel de salud pública y animal, en la generación de vacunas, un diagnóstico preciso a nivel de laboratorio y clínico además, de programas de medicina preventiva.

Se debe de realizar un ensayo genómico de los virus que circulan actualmente en México y relacionar la historia evolutiva, dando continuidad a posibles cambios divergentes o convergentes en un futuro, con implicaciones en el impacto clínico en los cerdos, o incluso en la salud pública por recombinaciones genéticas interespecies.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Adeyefa C, Quayle K, McCauley J. (1994). A rapid method for the analysis of influenza virus genes: application to the reassortment of equine influenza virus genes. *Virus Res* 32: 391–399.
- 2) Alexander I, Karasin I, Brown H, Carman S, Olsen C. (2000). Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. *J Virol.* 74(19)
- 3) Ali A, Khatri M, Wang L, Saif Y, Lee CW. (2012). Identification of swine H1N2/pandemic H1N1 reassortant influenza virus in pigs, United States. *Vet Microbiol.* 158(1-2): 60-8.
- 4) Amorim M, Digard P. (2006). Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine* 24 (44–46), 6651–6655.
- 5) Arbeláez A, Calderón D, Rincón M, Lora A, Marcela Mercado. (2008). Improvement of two diagnostics methods for detection of influenza swine virus. *Revista de la Facultad de Ciencias.* 13: 65-74.
- 6) Avalos HA. Identificación de variantes del virus de la influenza porcina en México con la técnica de RT-PCR RFLP's. (tesis de maestría). Coyoacán, Méx, D.F.: FMVZ. UNAM, 2013.
- 7) Bae S, Cheong H, Lee J, Cheong C, Kainosho M, Choi B. (2001). Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10602–10607.
- 8) Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok R. (1994). Structure of influenza virus RNP. I Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J.* 13:3158–65.

- 9) Biswas S, Nayak D. (1994). Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol.* 68 (3), 1819–1826.
- 10) Beltrán R, Martínez R, Trujillo M, Sánchez J. Identificación del virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 mediante RT-PCR. Memorias de XLII Congreso Nacional de 2007. julio 25-28; Querétaro (Querétaro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007: 190.
- 11) Bouvier N, Palese P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 (4), D49–53.
- 12) Briedis D, Lamb R. (1982). Influenza B virus genome: sequences and structural organization of RNA segment 8 and them RNAs coding for the NS1 and NS2 proteins. *J Virol.* 42:186–93.
- 13) Briedis D, Lamb R, Choppin P. (1982). Sequence of RNA segment 7 of the influenza B virus genome: partial amino acid homology between the membrane proteins (M1) of influenza A and B viruses and conservation of a second open reading frame. *Virology.* 116:581–8.
- 14) Brown I. Alexander D, Chakraverty P, Harris P, Manvell R. (1994). Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Vet Microbiol.* 39(1-2):125-34.
- 15) Brown IH. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology.* 74: 29-46.

- 16)** Buckler-White J, Naeve C, Murphy B. (1986). Characterization of a gene coding for M proteins which is involved in host range restriction of an avian influenza A virus in monkeys. *J. Virol.* 57:697-700.
- 17)** Bulletin of the World Health Organization, 58 (4): 585-591 (1980)
- 18)** CDC. (2009). Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 58; 433-435.
- 19)** Chi-Ho Chan, Lin KL, Chan Y, Wang YL, Chi YT, Tu HL, Shieh HK, Liu WT. (2006). Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Viro Met.* 136; 38–43.
- 20)** Chen W, Calvo P, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink J, Yewdell J. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7;1306–12.
- 21)** Chen W, Shih S. (2009). Genomic signatures of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 15; 1897–1903.
- 22)** Cheung C, Poon L, Lau A, Shortridge K, Gordon S, Guan Y, Peiris J. (2002). Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by Influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 360:1831–1837.
- 23)** Compans R, Content J, Duesberg P. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol.* 10: 795–800.

- 24)** Dauber B, Heins G, Wolff T. (2004). The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Virol.* 78: 1865–72.
- 25)** Dawood, F, Jain S, Finelli L, Shaw M, Lindstrom S, Garten R, Gubareva L, Xu X, Bridges C, Uyeki T. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360; 2605–2615.
- 26)** Dee S. (1996). The porcine respiratory disease complex. Are subpopulations important? *Journal Swine Health and Production.* 4:147-149.
- 27)** De Jong M, Simmons C, Thanh T, Hien V, Smith G, Chau T, Hoang D, Chau N, Khanh T, Dong V, Qui P, Cam B, Ha do Q, Guan Y, Peiris J, Chinh N, Hien T, Farrar J. (2006). Fatal outcome of human Influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature Medicine* 12:1203–1207.
- 28)** Desselberger U, Racaniello V, Zazra J, Palese P. (1980). The 3' and 5' terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 8; 315–328.
- 29)** Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy A, Hart D, Baudin F, Cusack S, Ruigrok R. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458 (7240), 914–918.
- 30)** Dimmock N, Easton A, Leppard K. (2001). *Introduction to Modern Virology.* 5th edition. Blackwell Science, Oxford. 449 pp.
- 31)** Ducatez M, Webster R, Webby R. (2008). Animal influenza epidemiology. *Vaccine.* 26: 67 –69.

- 32)**Ellis J, Zambon M. (2002)Molecular diagnosis of influenza. *Rev. Med. Virol.* 12: 375–389.
- 33)**Escalera M, Cobian G, Soto del Rio M, Isa P, Sanchez I, Parissim A, Martinez M, Romero P, Velazquez L, Huerta B, Nelson M, Montero H, Vinuesa P, Lopez S, Arias C. (2012). Characterization of an influenza A virus in Mexican swine that is related to the A/H1N1/2009 pandemic clade. *Virology* 433; 176–182.
- 34)**Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 783–791.
- 35)**Franck F. (1992). *Virologia Veterinaria* Edit. Acribia. 2da edic. 490-495.
- 36)**Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E, Brownlee G. (2003). Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J. Biol. Chem.* 278 (22), 20381–20388.
- 37)**García J, Ramos C. (2006). La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Publica de México.* 48: 244-267.
- 38)**García M, Mercado C, Martínez R, Rosales F, García A. Determinación de los títulos de anticuerpos conferidos por una vacuna comercial para influenza porcina en hembras de pie de cría con una y dos aplicaciones. *Memorias de XIX Congreso Nacional de 2007.* julio 25-28; Querétaro (Querétaro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007: 234.
- 39)**Garten R, (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197–201.

- 40)**Geo V, Westover K. (2008). Origin of the 1918 Spanish influenza virus: A comparative genomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 47: 1100 –1110.
- 41)**González C, Ramírez M, Stephano H, Espino R. Evaluación serológica del virus de la influenza porcina en cerdos de 10 granjas de 5 Estados de la República Mexicana. *Memorias XXV Congreso Nacional de 1990 agosto 15-18; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1990: 148-149.*
- 42)**Gramer M. (2005). Defining swine influenza virus. *J Swine Health Prod.* ;13 (3):157–160.
- 43)**Gramer M. (2008). An update on swine influenza ecology and diagnostics. *Proceeding, 39th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. March 8-11, San Diego, CA, USA*
- 44)**Gramer M. (2009). *Influenza Virus: Basic Virology and Pigs, People, and Poultry: Influenza as a Zoonotic Disease.*
- 45)**Greger M. (2006). *Bird flu: a virus of our own hatching, Lantern Books, New York City, USA.*
- 46)**Gorman O, Bean W, Kawaoka Y, Webster R. (1990). Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol.* 64(4):1487-97.
- 47)**Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science.* 293:1840-1842.
- 48)**Hatta M, Kawaoka Y. (2003). The NB protein of influenza B virus is not necessary for virus replication in vitro. *J Virol.* 77:6050–4.

- 49)**Hilleman M. (2002). Realities and enigmas of human viral Influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20:3068–3087.
- 50)**Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster R, Pérez D. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.* 146: 2275–2289.
- 51)**Horimoto T, Kawaoka Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol.* 3(8):591-600.
- 52)**Hulse D, Sturm K, Humberd J, Seiler P, Govorkova E, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen T, Long H, Naipospos T, Chen H, Ellis T, Guan Y, Peiris J, Webster R. (2005). Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *PNAS*, 102, 10682-10687.
- 53)**Ito T, Gorman O, Kawaoka Y, Bean W, Webster R. (1991). Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J. Virol.* 65:5491-5498.
- 54)**Ito T, Gorman O, Kawaoka Y, Bean W, Webster R. (1991). *J. Virol.* 65(10):5491. Evolutionary Analysis of the Influenza A Virus M Gene with Comparison of the M1 and M2 Proteins. *J Virology.* 5491-5498
- 55)**Jiménez L, Mercado C, Carreón R, Herradora M. Determinación de anticuerpos contra el virus de H3N2 en cerdos de diferentes sistemas de producción en México. *Memorias de XLI Congreso Nacional de 2006.* agosto 16-19; Ixtapa (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2006: 200.

- 56)**Karasin A, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, Scherba G, Anderson G, Olsen C. (2002). Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1073–1079.
- 57)**Karasin A, West K, Carman S, Olsen C. (2004). Characterization of avian H3N3 and H1N1 in fluenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J Clin Microbiol.* 42(9):4349-54.
- 58)**Karasin A, Carman S, Olsen C. (2006). Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005). *J Clin Microbiol*, 44, 1123-1126.
- 59)**Kash J, Tumpey T, Proll S, Carter V, Perwitasari O, Thomas M, Basler C, Palese P, Taubenberger J, García A, Swayne D, Katze M. Kash J. (2006). Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 Influeza virus. *Nature* 443:578–581.
- 60)**Kazutaka K, Kazuharu M, Kei-ichi K, Takashi M. (2002). "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform". *Nucleic Acids Research* **30** (14): 3059–66. doi:10.1093/nar/gkf436. PMC 135756. PMID 12136088.
- 61)**Kochs G, Garcia A, Martinez L. (2007). Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol.* 81(13): 7011–21.
- 62)**Kumar S, Tamura K, Nei M. (2004). MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5, 150–163.
- 63)**Labadie K, Dos Santos A, Rameix-Welti M, Van Der Werf S, Naffakh N. (2007). Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A

- viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology*. 362:271-282.
- 64)** Lamb R, Choppin P, Chanock R, Lai C. (1980). Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77:1857–61.
- 65)** Lamb R, Lai C, Choppin P. (1981). Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78 (7):4170–4.
- 66)** Lindstrom S, Endo A, Sugita S, Pecoraro M, Hiromoto Y, Kamada M, Takahashi T, Nerome K. (1998). Phylogenetic analyses of the matrix and non-structural genes of equine influenza viruses. *Arch Virol*. 143(8):1585-98.
- 67)** Liu W, Wei M, Tong Y, Tang F, Zhang L, Fang L, Yang H, Cao WC. (2011). Seroprevalence and genetic characteristics of five subtypes of influenza A. *Vet J*. 187(2):200-6.
- 68)** Manjarrez M, Rosete D, Higuera A, Ocadiz R, Pérez J, Cabello C. (2012). Start of a Pandemic: Influenza A H1N1 Virus. *Respiratory Diseases* Mostafa Ghanei (Ed.), ISBN: 978-953-307-964-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/respiratory-diseases/start-of-a-pandemic-influenza-a-h1n1-virus>
- 69)** Manjarrez M, Cabello C, Rosete D. (2010). Biología del virus: familia Orthomyxoviridae. Em Perez J, Salas J, Palomar A, Vazquez J. editores. *Influenza por El virus A/H1N1: Um panorama integral*. México: Graphimedica. 2010; 26-41.

- 70)** Mehle A, Dugan V, Taubenberger J, Doudna J. (2011). Reassortment and Mutation of the Avian Influenza Virus Polymerase PA Subunit Overcome Species Barriers *Journal of Virology*. 1750–1757.
- 71)** Meléndez H, Cervantes G, Ramos G, Cravioto A. (2005). Impacto de la genómica bacteriana en la medicina humana. *Rev. Fac. Med.* 48(1): 18-23.
- 72)** Miotto O, Heiny A, Albrecht R, García A, Tan T, August J, Brusic V. (2010) *PLoS One* 5, e9025.
- 73)** Moreno A, Barbieri I, Sozzi E, Luppi A, Lelli D, Lombardi G, Zanoni MG, Cordioli P. (2009). Novel swine influenza virus subtype H3N1 in Italy. *Vet Microbiol.* 138(34):361-7.
- 74)** Moreno A, Di Trani L., Alborali L, Vaccari G, Barbieri I, Falcone E, Sozzi E, Puzelli S, Ferri G, Cordioli P. (2010). First pandemic H1N1 outbreak from a pig farm in Italy. *Open Virol. J.* 4, 52–56.
- 75)** Morilla A. Jeffrey J. Kyoung-Jin Yoon. (2004). Enfermedades víricas emergentes. *Multimedica Ediciones veterinarias edición española.* 29-35.
- 76)** Morilla A. (2009). Medidas de bioseguridad y recomendaciones para reducir el riesgo de nuevas cepas de influenza. *Acontecer porcino.* 96; 50-54.
- 77)** Murti K, Webster R, Jones I. (1988). Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology.* 164: 562–6.
- 78)** Naffakh N, Van der Werf S. (2009). April 2009: an outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus with evidence for human-to-human transmission. *Microbes and Infection.* 11: 725-728.

- 79)** Nelli K, Kuchipudi V, White A, Baquero P, Dunham O, Chang K. (2010). Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *MBC Veterinary Research*. 6-4.
- 80)** Neumann G, Brownlee G, Fodor E, Kawaoka Y. (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 283, 121–143.
- 81)** Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 459:931-939.
- 82)** Olsen C, Karasin A, Carman S, Li Y, Bastien N, Ojkic D, Alves D, Charbonneau G, Henning B, Low D, Burton L, Broukhanski G. (2006). Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis*, 12, 1132-1135.
- 83)** Pan C, Cheung B, Tan S, Li C, Li L, Liu S, Jiang S. (2009). Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PLoS One* 5, e9549.
- 84)** Pereda A, Rimondi A, Cappuccio J, Sanguinetti R, Angel M, Ye J, Sutton T, Dibarbora M, Olivera V, Craig M, Quiroga M, Machuca M, Ferrero A, Perfumo C, Perez D. (2011). Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza Other Respir. Viruses* 5, 409–412.
- 85)** Payungporn S, Crawford P, Kouo T, Chen L, Pompey J, Castleman W, Dubovi E, Katz J, Donis R. (2008). Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis*. 14(6):902-8.

- 86)** Pensae M. (1989). *Virus infection of porcines*. B.V. Amsterdam, Oxford, New York and Tokyo. Ed. Elsevier Science Publisher. 193-203.
- 87)** Pease A, Solas D, Sullivan E, Cronin M, Holmes P, Fodor S. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 5022–5026.
- 88)** Peiris J, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster R, Shortridge K. (2001). Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol*, 75, 9679-9686.
- 89)** Pérez J, Palacios J, Martínez O, Arias S, Ortiz E. (2007). Porcentaje de seropositividad de influenza porcina en la zona de los altos. *Acontecer porcino*. 84; 19-22.
- 90)** Pérez T. Estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados por el virus de la influenza A H1N1 durante el periodo de la pandemia abril-mayo 2009. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
- 91)** Posada D. (2008). JModeltest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- 92)** Quinn T. (2008). *Flu: A social history of influenza*. New Holland Publishers (UK) Ltd, ISBN: 978-1845379414.
- 93)** Rambaut, A. 2009. FigTree v1.3.1 2006-2009 [Readme file]. Accessed on October 12, 2011 Available with the program package at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- 94)** Reid A, Fanning T, Hulting J, Taubenberg J. (1999). Origin and evolution of the 1918 Spanish influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(4): 1651-1656.
- 95)** Resa I, Jorba N, Coloma R, Ortin J. (2011). The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol*. 8:207-215.
- 96)** Rogers G, Paulson J. (1983). Differential sensitivity of human, avian and equine influenza viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology*. 127; 361-73.
- 97)** Rosales F, García R, Espejo R, Mercado G, Aguilera A. Intervet México S.A de C.V., Rancho Covadonga., Estimulo de anticuerpos de 2 vacunas comerciales (H1N1 + H3N2) y uso de 2 sistemas de vacunación en primer vacunación de cerdas de reemplazo. *Influenza porcina*.
- 98)** Rott R, Orlich M, Scholtissek C. (1979). Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains. *J. Gen. Virol*. 44:471-477.
- 99)** Rozas J, Sanches-DelBarrio J, Messeguer X, Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- 100)** Salomon R, Webster R. (2009). The Influenza virus enigma. *Cell* 136:402-410.
- 101)** Schena M, Shalon D, Davis R, Brown P. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467–470.

- 102)**Scholtissek C, Buerger H, Kistner O, Shortridge K. (1985). The nucleoprotein as a possible major factor in determining hosts specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 147, 287-294
- 103)**Scholtissek C. (1990). Pigs as the 'mixing vessel' for the creation of new pandemic influenza A viruses. *Med Princip Prac*, 2, 65–71.
- 104)**Scholtissek C, Stech J, Krauss S, Webster R. (2002). Cooperation between the hemagglutinin of avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses. *J. Virol.* 76, 1781–1786.
- 105)**Shu B, Garten R, Emery S, Balish A, Cooper L, Sessions W, Deyde V, Smith C, Berman S, Klimov A, Lindstrom S, Xu X. (2012). Genetic analysis and antigenic characterization of swine origin influenza viruses isolated from humans in the United States, 1990–2010. *Virology* 422; 151–160.
- 106)**Sguazza G, Fuentealba N, Tizzano M, Galosi C, Pecoraro M. (2009). Complete genome amplification of Equine influenza virus subtype 2. *Revista Argentina de Microbiología.* 41: 207-211.
- 107)**Stamatakis A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688–2690.
- 108)**Stephane B, Stephen C, Rob W. H. Ruigrok, Darren J. (2010). Influenza A Virus Polymerase: Structural Insights into Replication and Host Adaptation Mechanisms. *J Biol Chem.* 285, no.37; 28411–28417
- 109)**Straw E, D´Allaire S, Mengeling L, Taylor J. (2006). *Diseases of swine* 9 Edit. Ames, Iowa U.S.A.

- 110)**Subbarao E, London W, Murphy B. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol.* 67:1761-1764.
- 111)**Tang J.W, Shetty N, Lam T.T, Hon K.L. (2010). Emerging, novel, and known influenza virus infections in humans. *Infect Dis Clin North Am.* 24:603-617.
- 112)**Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- 113)**Talledo M, Zamueta K. (2009). Los virus de influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Rev. Perú. Bio.* 16:227-238.
- 114)**Taubenberger K, Morens M. (2006). 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; 12; 15-22.
- 115)**Thacker E, Janke B. (2008). Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas. *The Journal of Infectious Diseases.* 197:19–24.
- 116)**Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, et al. (2013) New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog* 9(10): e1003657. doi:10.1371/ journal.ppat.1003657.
- 117)**Trujano M, Palacios JM. Impacto epidemiológico del virus de influenza en porcinos. *Memorias de XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005: 144-146.*

- 118)**Tu J, Zhou H, Jiang T, Li C, Zhang A, Guo X, Zou W, Chen H, Jin M. (2009). Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol.* 154(5):887-90.
- 119)**Van Reeth K. (2007). Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk, *Veterinary Research* 38; 243-260
- 120)**Vincent A. (1998). Review of swine influenza diagnostics. *Journal Swine Health and Production.* 1998; 6 (1): 33–34.
- 121)**Vincent A, Swenson SL, Lager KM, Gauger PC, Loiacono C, Zhang Y. (2009). Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. *Veterinary Microbiology* 137; 51–59.
- 122)**Wanitchang A, Jengarn J, Jongkaewwattana A. (2011). The N terminus of PA polymerase of swine-origin influenza virus H1N1 determines its compatibility with PB2 and PB1 subunits through a strain-specific amino acid serine 186. *Virus Research.* 155; 325–333.
- 123)**Webby R, Rossow K, Erickson G, Sims Y, Webster R, (2004). Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus. Res.* 103, 67–73.
- 124)**Webby R, Webster R, Richt J. (2007). Influenza viruses in animal wildlife Populations. *Curr Top Microbiol Immunol*, 315, 67-83.
- 125)**Webster R, Peiris M, Chen H, Guan Y. (2006). H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis*, 12, 3-8.
- 126)**Webster R, Bean W, Gorman O, Chambers T, Kawaoka Y. (1992). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews* 56; 152-179

- 127)**Weingartl H, Berhane Y, Hisanaga T, Neufeld J, Kehler H, Emburay-Hyatt C, Hooper-McGreevy K, Kasloff S, Dalman B, Bystrom J, Alexandersen S, Li Y, Pasick J. (2010). Genetic and pathobiologic characterization of pandemic H1N1 2009 influenza viruses from a naturally infected swine herd. *J Virol*. 84:2245-56.
- 128)**Wenjun M, Gramer M, Rossow K, Yoon K. (2006). Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwestern United States. *J Virol*, 80, 5092-5096.
- 129)**Wenjun M, Vincent A, Gramer M, Brockwell C, Lager K, Janke B, Gauger P, Patnayak D, Webby R, Richt J. (2007). Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(52): 20949-54.
- 130)**Wenjun M, Kahn R, Richt J. (2009). The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J Mol Genet Med*. 3(1), 158-166
- 131)**Yu H, Hua H, Zhang Q, Liu T, Liu H, Li G, Tong G (2008). Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. *J Clin. Microbiol*, 46, 1067-1075.
- 132)**Yu H, Hua R, Wei T, Zhou Y, Tian Z, Li G, Liu T, Tong G. (2008). Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China. *Vet Microbiol*. 131(1-2):82-92.
- 133)**Zhou N, Senne D, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon K, Krauss S, Webster R. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol*, 73, 8851-8856.
- 134)**Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y, Wentworth DE. (2009). Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *Journal of virology*. 83, no. 19; 10309–10313.