



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA-INMEGEN

***Características moleculares de la influenza AH1N1
pdm09 prevalente en México durante las
temporadas de invierno 2012-1014.***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DEL ROCÍO ARELLANO LLAMAS

TUTOR PRINCIPAL

DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA

FACULTAD DE MEDICINA-INMEGEN

COMITÉ TUTOR

DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS

FACULTAD DE MEDICINA-INER

DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

IIB UNAM

MÉXICO, CDMX AGOSTO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Contenido

Introducción	3
Ciclo de replicación y proceso de infección viral	9
<i>Antigenic shift y Antigenic drift</i>	11
Pandemias por virus de influenza A	12
Pandemia de 2009	14
Epidemiología	17
Filogenia molecular	18
Secuenciación del genoma completo en la vigilancia epidemiológica	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos Específicos	20
MATERIAL Y MÉTODO	20
Obtención y tipificación de las muestras clínicas	20
Extracción de RNA, reverso-transcripción y amplificación de cDNA	21
Secuenciación del genoma viral	21
Arreglos de re-secuenciación	22
Secuenciación Masiva en Paralelo	23
Análisis de Mutaciones	23
Análisis de sitios antigénicos de HA	23
Filogenia	24
Resultados	24
Sustituciones detectadas mediante secuenciación de genoma completo de virus de influenza AH1N1 09pdm	26
Análisis filogenético	30
Caracterización molecular de HA	40
Discusión	41
Conclusiones	46
ANEXO I	47
Referencias	53

Introducción

La influenza es la enfermedad febril aguda altamente contagiosa, transmisible de humano a humano, propagada mediante los virus del mismo nombre, a través de aerosoles que infectan principalmente las células epiteliales del tracto respiratorio; causa morbilidad y mortalidad significativa, por lo que requiere de vigilancia epidemiológica continua (Molinari et al., 2007). Los genomas de los virus de influenza son plásticos ya que pueden modificarse por mutaciones puntuales o por rearrreglos, lo que contribuye a que emerjan nuevas cepas con potencial de generar epidemias o incluso pandemias que, a su vez, provocan impacto económico, ausentismo, consultas médicas y hospitalizaciones en la población por lo que la identificación y caracterización de las variantes de los virus de influenza circulantes son esenciales para detectar la emergencia de nuevos subtipos originados por distintos mecanismos que pudieran generar epidemias anuales (Hilleman, 2002).

La Influenza es una enfermedad infecciosa causada por virus de la familia *Orthomyxoviridae* clasificados en A, B y C, y son los de influenza tipo A los responsables de las epidemias periódicas de décadas pasadas debido a la variedad hospederos que los portan. La influenza B es específica de humanos y su potencial pandémico es realmente bajo aunque puede causar enfermedades respiratorias severas. La influenza C, causa enfermedades respiratorias leves en humanos y en algunos animales, pero no se han detectado afectaciones severas como el caso de los anteriores (Strauss, James Strauss, 2008; Wagner, Hewlett, Bloom, & Camerini, 2009).

Estructura general de los virus de influenza

Los virus de influenza son esféricos y miden de 80 a 120nm de diámetro, en su envoltura viral se encuentran las glicoproteínas hemaglutinina (HA), de estructura globular conformada por cabeza y tallo cuya función es permitir la entrada de los virus a las células mediante el reconocimiento de receptores que contienen ácido siálico (SA) en la superficie; y neuraminidasa (NA), responsable de la liberación de la progenie viral mediante el rompimiento de la unión de HA al SA, además del canal

iónico (M1); las proteínas HA y NA son las más variables y se clasifican en subtipos antigenicamente diversos; existen 18 subtipos de HA (HA1-HA18) y 11 de NA (NA1-NA11) (Tong, 2019). Las NAs están filogenéticamente divididas en distintos grupos: grupo 1, conformado por N1, N4, N5 y N8 y el grupo 2, conformado por N2, N3, N6, N7 y N9 (Yoo, 2011). Las partículas virales nuevas e infecciosas o viriones están constituidos por 7 u 8 segmentos lineales de RNA de cadena sencilla (ssRNA) antisentido; específicamente, la influenza tipo A consta de 8 segmentos y el genoma varía entre 10 a 14.6kb y los segmentos virales tienen un rango de longitud de 874 a 2396nt siendo los más grandes los que corresponden al complejo polimérico PB2, PB1 y PA, seguido por HA, el de la proteína de exportación nuclear (NP), NA, y canal iónico (M) y por último el gen que codifica las proteínas no estructurales 1 y 2 (NS); estos últimos codifican 2 proteínas por medio de empalme alternativo (figura 1). La estructura segmentada del genoma permite el intercambio de genes entre virus de influenza del mismo tipo o re-arreglo (Strauss, James Strauss, 2008; Wagner et al., 2009).

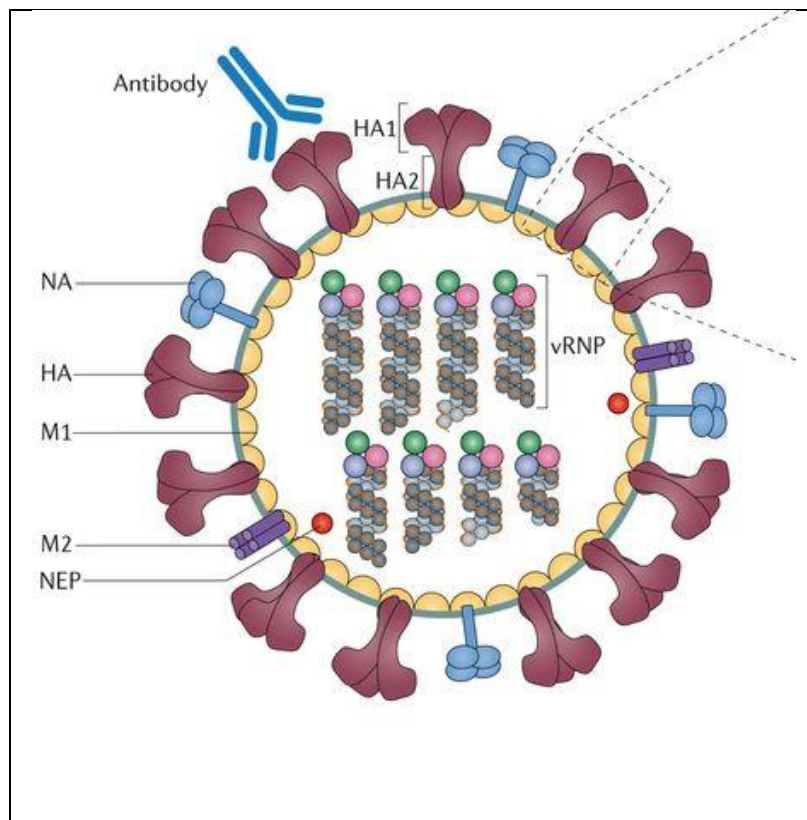


Figura 1: Estructura general del virus de influenza donde se muestran los 8 segmentos virales organizados en ribonucleoproteínas. En la superficie del virus se encuentran la HA, que es el blanco principal de los anticuerpos y su dominio globular HA1; NA, el canal iónico M2, la proteína de exportación nuclear NEP y la matriz constituida por M1. Tomada de(Petrova & Russell, 2018).

Origen de los Virus de influenza A

Los virus de influenza se han encontrado en diferentes especies, humanos, cerdos, caballos, felinos, animales marinos y en una amplia gama de aves domésticas, pero el pool genético de los virus de influenza en las aves acuáticas provee toda la diversidad requerida para el surgimiento de una variante de virus con capacidad pandémica (B. Olsen et al., 2006). En el caso de las aves acuáticas, los virus de influenza parecen estar bien adaptados a su hospedero ya que no les causan signos de enfermedad (Webster, Bean, Gorman, Chambers, & Kawaoka, 1992) o les causan síntomas leves por su baja patogenicidad (LPAI, siglas en inglés), aunque las variantes H5 y H7 si se consideran altamente patógenas (HPAI, siglas en inglés) y causan enfermedad severa y muerte de aves silvestres y domésticas debido al contenido de aminoácidos básicos en el sitio de corte de HA, H0, lo que aumenta su patogenicidad (DJ, 2000). Así como en las infecciones aviarias, algunas variantes de los virus de influenza pueden infectar cerdos y no provocarles síntomas, mientras que otras variantes les pueden producir síntomas de tipo influenza como fiebre, tos y secreción nasal y en contraste, los cerdos pueden ser infectados por subtipos virales H1N1, H3N2 y H1N2 (Fouchier et al., 2005; Webster et al., 1992). Todos los virus de influenza A conocidos se han perpetuado a través de las aves acuáticas y se ha propuesto la hipótesis de que son las aves acuáticas la fuente principal de todos los virus de influenza de otras especies (Webster et al., 1992), ya que en las poblaciones de aves circulan todos los subtipos de HA y NA descritos, excepto los que corresponden a los murciélagos.

Así como las aves acuáticas son el reservorio de los virus de influenza, las aves de corral y los cerdos sirven como portadores intermediarios a los humanos y juegan un papel muy importante en la ecología de la influenza (Webby & Webster, 2001). Ocasionalmente los virus de influenza A se transmiten de las aves a los mamíferos,

pero es debido a que los cerdos pueden ser infectados por virus de influenza aviar y humana que se pueden producir rearrreglos entre los virus aviares, porcinos y humanos, que se pueden originar variantes con capacidad pandémica ya sea por transmisión directa o indirecta (Ma et al., 2009), dicho proceso responde a la teoría de la vasija de mezcla (Scholtissek, Bürger, Kistner, & Shortridge, 1985).

La hipótesis de la vasija de mezcla consiste en tres partes: 1) los cerdos son susceptibles a los virus de influenza A aviar y humana; 2) los rearrreglos virales porcino/aviar/humano ocurren en los cerdos y 3) los cerdos pueden transmitir los virus rearrreglados a las personas (Ma et al., 2009). La evidencia que apoya la teoría de la vasija de mezcla fue el surgimiento de los virus doble (humano/porcino) y triple (aviar/humano/porcino) H3N2, H1N2, rH1N1 y H3N1 que se detectaron en cerdos en 1998 además H3N2, H1N2 y H1N1 se convirtieron en las variantes circulantes predominantes en las poblaciones porcinas (B. Olsen et al., 2006; Webby & Webster, 2001; Yuan et al., 2009)

El virus de influenza A está ampliamente distribuido en cerdos alrededor del mundo y es el más transmitido de cerdo a cerdo por contacto con aerosoles además de otras rutas, por lo que los cerdos se consideran también como reservorios de Influenza A para otras especies (Cox & Subbarao, 2000; Torremorell, Allerson, Corzo, Diaz, & Gramer, 2012).

Entre los años 30's y 90's el virus más común de influenza porcina circulante era el de influenza porcina clásica A(H1N1), sin embargo a finales de los 90's emergieron múltiples subtipos de influenza porcina resultantes de los re-arreglos y triples re-arreglos que incluyeron genomas de influenza humana estacional H3N2, porcina H1N1 y subtipos circulantes en aves acuáticas silvestres de EUA, estos subtipos predominaron entre los cerdos de norte América (C. W. Olsen, 2002). El origen del subtipo viral AH1N1 de 2009 proviene del re-arreglo triple que contienen genes de influenza humana, porcina y aviar, en cerdos de Estados Unidos; el virus de influenza clásica porcina se re-arregló con virus contemporáneos de influenza humana AH3N2 y de influenza aviar americano de subtipo desconocido (rH3N2). Subsecuentemente se dio un nuevo re-arreglo entre rH3N2 y virus de influenza

porcina clásica lo cual se cree generó un nuevo virus de triple re-arreglo conocido como “Swine origin” influenza AH1N1 y con esto, se creó una brecha entre la H1 de influenza porcina clásica y la influenza estacional humana (swo-AH1N1) (figura 2). Desde 1977 hasta 2009 la influenza AH1N1 ha evolucionado antigénicamente y con base en la secuenciación de su genoma se ha hecho necesario actualizar constantemente el componente H1 de la vacuna contra la influenza (Garten et al., 2012; Holmes et al., 2005; Lindstrom et al., 1998).

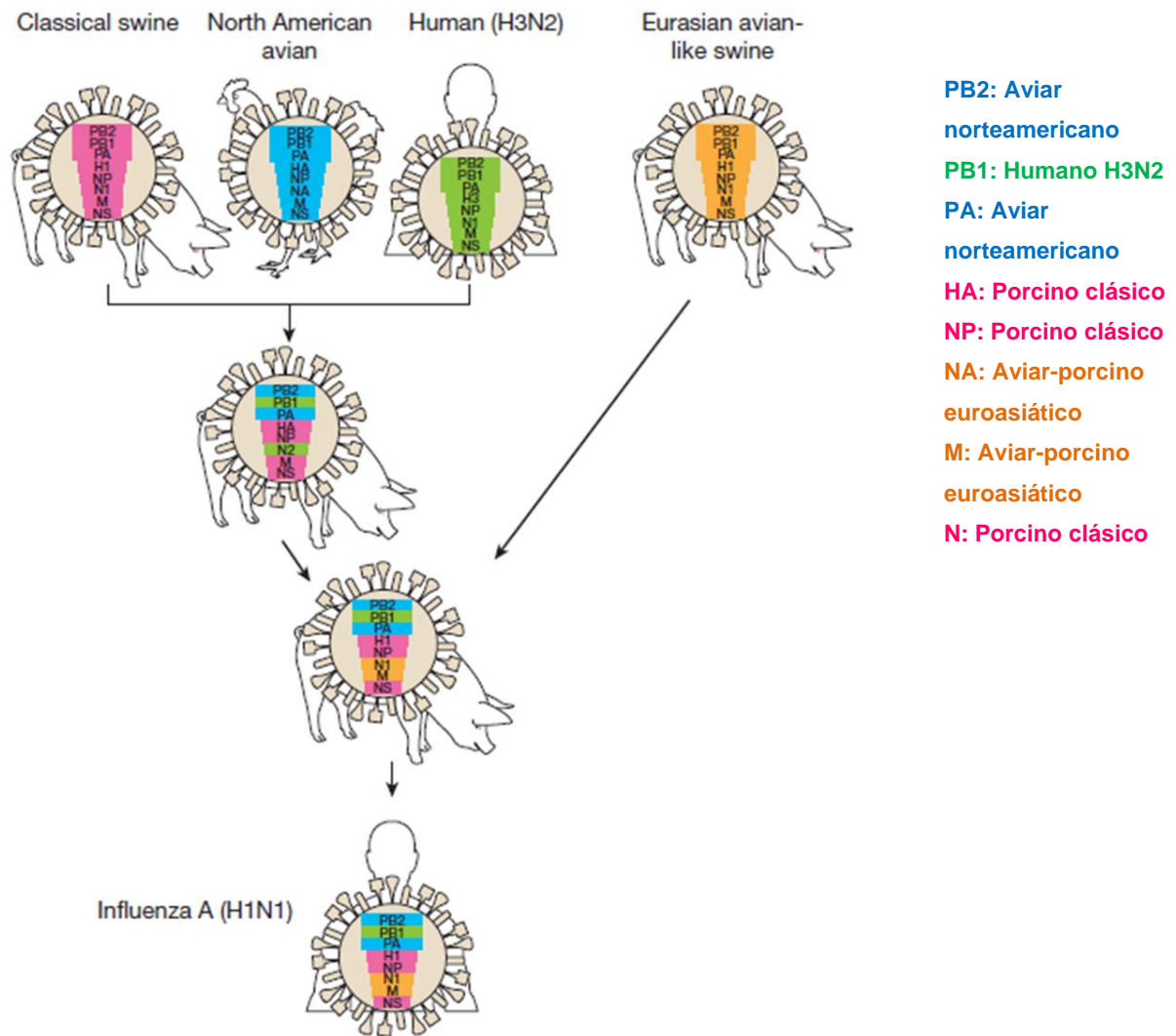


Figura 2: Triple re-arreglo entre virus porcino clásico, aviar norteamericano y humano H3N2 que dio origen al virus triple re-arreglante, el cual posteriormente se re-arregló con virus porcino-euroasiáticos para dar origen a la Influenza AH1N1 de 2009, que ahora circula en humanos, modificada de (Neumann, Noda, & Kawaoka, 2009)

Reconocimiento del receptor de ácido siálico

Como se ha mencionado previamente, los virus de influenza A infectan a una amplia variedad de animales, pero tienen ciertas restricciones que les impiden infectar a todos los animales por igual. Aunque se han presentado casos de transmisión inter especie como es el caso de los virus H1N1 aviarios encontrados en cerdos, los H3N2 humanos también encontrados en cerdos y los virus H1N1 porcinos encontrados en humanos. Una característica determinante en la especificidad por el hospedero es el tipo de enlace que se forma entre la HA y el SA, la unión de los virus de influenza A a la célula hospedera está mediada por el sitio de unión de HA y el tipo específico de SA unido a galactosa que posee la célula (Y. Suzuki, 2005). Los residuos que conforman el *pocket* de unión de HA determinan la especificidad de unión a receptor e interactúan con alguna de las dos principales especies de SA, el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) o el ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc) (T. Suzuki et al., 1997). El ácido siálico se une a la galactosa mediante una unión de tipo $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ y la distribución de la expresión de dichos tipos de unión varía entre especies; la mayoría de los virus detectados en humanos reconocen de forma preferencial NeuAc $\alpha 2,6$ Gal, mientras que en aves se reconoce en mayor medida a NeuAc $\alpha 2,3$ Gal (Rogers & Paulson, 1983), por ejemplo: los virus de H1 de humanos presentan aspartato en la posición 190, que determina la unión de tipo $\alpha 2,6$ mientras que en virus H1 de aves, en la misma posición, se encuentra glutamato afín a la unión $\alpha 2,3$ (Gamblin et al., 2004; Tuzikov et al., 2002). El reconocimiento del receptor es esencial para iniciar la replicación viral y en cerdos dicho reconocimiento es igual para los dos tipos de unión, tanto para NeuAc $\alpha 2,3$ Gal como para NeuAc $\alpha 2,6$ Gal, aunque se ha reportado que la unión $\alpha 2,6$ predomina ligeramente (Mitnaul et al., 2002; T. Suzuki et al., 1997). El receptor en las células epiteliales humanas del tracto respiratorio es NeuAc $\alpha 2,6$ Gal y NeuAc $\alpha 2,3$ Gal en células epiteliales intestinales de aves, específicamente de patos, lo que contribuye también a la restricción parcial de hospedero y a la teoría de la “vasija de mezcla” ya que ambos receptores se encuentran en la tráquea de los cerdos (Horimoto et al., 2002; Y. Suzuki, 2005).

Ciclo de replicación y proceso de infección viral

El mecanismo de infección viral consta de cinco pasos, el primer paso en el ciclo de replicación es la unión y entrada del virus a la célula hospedera que, como ya se ha mencionado, es mediante la unión del receptor de SA de la célula huésped a la proteína de superficie HA de los virus de influenza. La entrada está mediada por endocitosis por clatrina, y así los virus parasitan a la célula para producir nueva progenie viral. Aunque también se ha descrito la entrada por macropinocitosis o independiente de clatrina (Escalera-Zamudio et al., 2012; Matsuoka et al., 2013).

A pH bajo el endosoma sufre un cambio conformacional irreversible que expone el N-terminal de la subunidad HA2 (péptido de fusión) lo que resulta en la unión de la membrana del endosoma a la membrana del virus. Dentro de los virus el medio se acidifica gracias al flujo de protones que pasa a través del canal iónico M2 y así disociar a la matriz viral compuesta por M1 de las ribonucleoproteínas virales (vRNP). Cada vRNP está compuesta por uno de los 8 segmentos virales de RNA envuelto por NP y asociados al complejo de polimerización. Una vez disociados de M1 la vRNP se liberan en el citoplasma y después serán importadas al núcleo, mediante factores nucleares de importación como importinas α y β . (Matsuoka et al., 2013); **2) Replicación y transcripción del genoma viral:** La replicación y transcripción de los RNA's virales se llevan a cabo en el núcleo celular y son catalizados por el complejo de polimerización compuesto por las subunidades PB2, PB1 y PA. La replicación de RNA's virales comienza con la síntesis de una copia de sentido positivo del RNA- viral (cRNA). El cRNA es copiado para así generar copias nuevas de vRNA- (Petrova & Russell, 2018; Yoo, 2011). La transcripción inicia al unirse PB2 al 5' de la estructura *cap* de los mRNAs celulares; la actividad endonucleasa de PA retiene la estructura *cap* y los 10-13 nucleótidos siguientes, incluidos con el *cap* que servirán como primer para la síntesis de mRNA viral y, PB1 es quien sintetiza los mRNA virales; **3) Traducción del RNAm a proteínas:** la traducción se lleva a cabo por la maquinaria celular (Webby & Webster, 2001).

Después de sintetizarse las unidades de polimerización y el NP, se importan al núcleo para catalizar la replicación y transcripción de vRNA. M1, NEP/NS2 y NS1

también se importan al núcleo para llevar a cabo sus funciones de exportación y de procesamiento y exportación de mRNA viral y celular (Matsuoka et al., 2013); **4)** Formación y ensamblaje de las nuevas partículas virales: Después de la traducción las proteínas HA, NA y M2 entran a l retículo endoplásmico donde son glicosiladas o palmitiladas según sea el caso. El transporte de las proteínas virales depende de los microtubulos celulares, ya en la membrana plasmática, HA y NA se asocian con cúmulos de esfingolípidos y colesterol. El ensamble e incorporación de los 8 vRNPs requiere de la interacción entre M1, la membrana lipídica, los vRNPs y NEP/NS2; **5)** Liberación de los virus: La actividad enzimática de NA rompe el enlace entre SA y HA, lo que permite la liberación de la progenie viral y evita la aglutinación (Matsuoka et al., 2013; Shinya et al., 2010; Webster et al., 1992; Yoo, 2011) (figura 3).

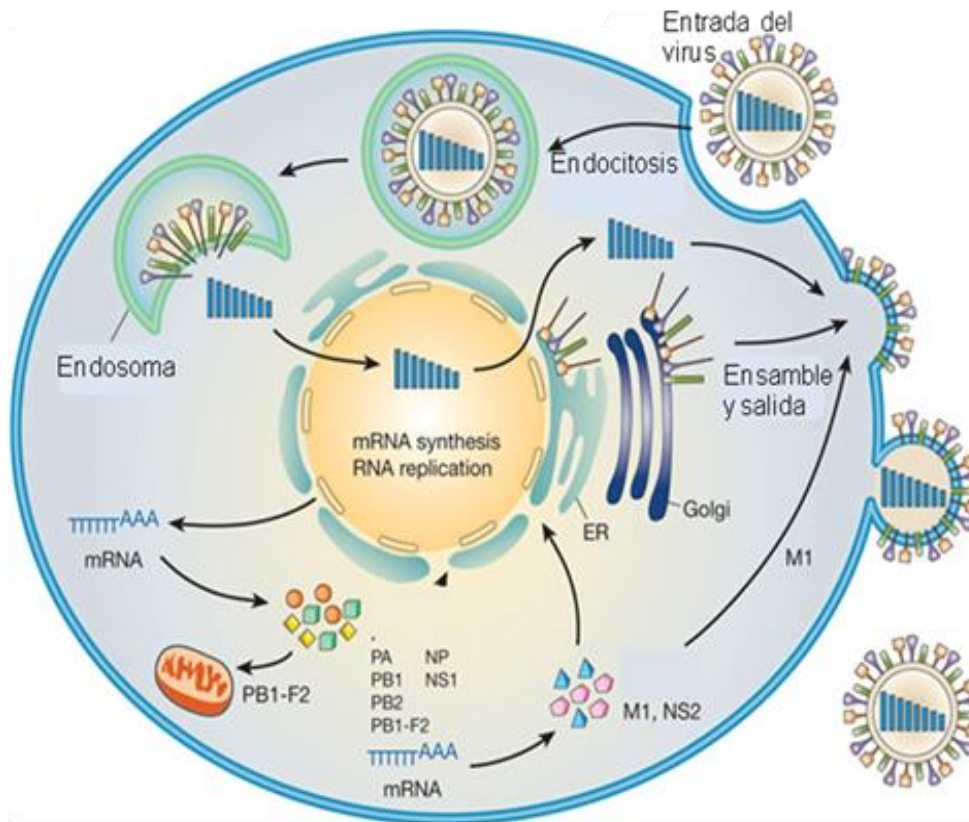


Figura 3: Ciclo de replicación del virus de influenza. Endocitosis, liberación de la vRNP, transporte de estas al núcleo, replicación y transcripción. Exportación de mRNA al citoplasma para traducción. Las proteínas

requeridas para la siguiente generación viral son transportadas al núcleo. M2 y NEP facilitan la exportación de vRNP desde núcleo. Ensamblaje y liberación de nueva progenie viral, modificado de (Neumann et al., 2009)

Durante el periodo de infección, los virus son liberados en secreciones nasales y oro-faríngeas y son esparcidos por medio de estornudos y tos. En adultos los primeros picos de liberación viral se dan en las 24 a 72 horas de la enfermedad sintomática y el último pico se da después de 5 días, en algunos casos la infección es mortal (Bell et al., 2006).

Antigenic shift y Antigenic drift

Entre las características sobresalientes de los virus de influenza A está la capacidad que tienen de evadir la respuesta inmunológica del hospedero por lo que son capaces de causar epidemias anuales y, en lapsos mayores, pandemias debido a la introducción de virus antigénicamente nuevos a una población humana no expuesta previamente a ellos.

Monitorear los cambios en los virus causantes de brotes infecciosos permite identificar su proveniencia, detectar una posible epidemia e identificar nuevas variantes antigénicas entre los virus A y B circulantes con el objetivo de asegurar que las vacunas vigentes contengan los componentes de los virus prevalentes.

La evolución de los virus de influenza A es consecuencia de su gran diversidad genética y, especialmente, de los tipos de hospederos que tiene, ya que son virus esencialmente aviares que periódicamente se pueden transmitir a otros géneros y especies, lo que incluye a los mamíferos. Además, como se mencionó anteriormente, los virus de influenza A abarcan distintos tipos serológicos gracias a las combinaciones posibles entre las 18 variedades de HA y las 11 variedades de NA existentes.

Debido a la diversidad de virus de influenza A y su tasa de mutación, la dinámica de transmisión y su evolución se deben considerar simultáneamente; la ecología, el ambiente y los factores socio–demográficos influyen la dinámica evolutiva de los virus de influenza, su adaptación está dirigida en gran parte por su capacidad de generar diversidad genética a través de mutaciones (*antigenic shift*) y rearreglos

(*antigenic drift*) (M. I. Nelson & Holmes, 2007). La replicación de los virus de influenza se lleva a cabo con baja fidelidad, ya que su complejo de polimerización carece de la capacidad de revisión y reparación (Pauly, Procaro, & Luring, 2017; Te Velthuis & Fodor, 2016); la tasa de mutación de los virus H1N1 ha sido estimada en 7.1×10^{-6} mutaciones por infección celular, lo que significa que hay un promedio de 2-3 mutaciones por cada genoma replicado (Pauly et al., 2017), la tasa de mutación determina la probabilidad de conferir resistencia a fármacos, escape de la respuesta inmunológica, o ampliación en el rango de hospederos (Song et al., 2005).

La dinámica evolutiva de los virus de influenza A se complica aún más debido a los eventos de rearrreglo en el que dos virus de diferentes líneas co-infectan a un mismo individuo e intercambian material genético que da como resultado en una tercera línea (Fauquet, Mayo, Maniloff, Desselberger, & Ball, 2005; Lin, Gregory, Bennett, & Hay, 2004; Wagner et al., 2009). Ante los nuevos virus generados mediante rearrreglos, la población humana es vulnerable ya que no ha sido antigénicamente expuesta, tal es el caso de las pandemias previas y la de 2009. El intercambio de genes virales completos así como los cambios puntuales en el genoma viral, son mecanismos genéticos que han mostrado ser determinantes en el origen de las variantes virales circulantes.

Pandemias por virus de influenza A

Las enfermedades infecciosas siguen siendo de gran importancia en el mundo moderno y la actividad humana ha acelerado la emergencia de patógenos nuevos y más potentes (Molinari et al., 2007), esto se ha hecho evidente con los brotes más recientes de influenza, por lo que desarrollar un plan de control de los brotes requiere del entendimiento de la epidemiología, genética y evolución de los patógenos emergentes para los que los humanos no tienen inmunidad preexistente. La lotería genética continúa transformando los más improbables escenarios en una realidad cercana (Mahan, Kubicek-Sutherland, & Heithoff, 2013).

Las enfermedades infecciosas han impactado a los sistemas de salud a nivel local, nacional e internacional y las lecciones aprendidas determinarán la respuesta global ante un nuevo brote en los años por venir.

En el siglo XX hubo 3 pandemias causadas por influenza, la primera en 1918 por H1N1, con una mortalidad estimada de 40-100 millones de personas alrededor del mundo y ha sido uno de los peores desastres de salud de la época moderna. La segunda pandemia por influenza se presentó en 1957 por H2N2 y la tercera en 1968 por H3N2 y resultaron en aproximadamente 50 millones, un millón y 500 mil muertes respectivamente (Cox & Subbarao, 2000). En Abril del 2009 se presentaron, en México y Estados Unidos, por primera vez casos de infección por virus de influenza no descrito, caracterizado por tener una combinación única de segmentos obtenida por cambio antigénico (Mahan et al., 2013)

Como se mencionó anteriormente, los virus de influenza circulan constantemente y son los virus de influenza estacional los causantes de epidemias anuales que resultan en millones de infecciones humanas alrededor del mundo. Durante dichas epidemias, la pérdida de vidas humanas y los costos económicos pueden ser considerables y llegar a ser devastadores durante los brotes mundiales causados por nuevas líneas virales. Además del impacto en los humanos, los brotes de virus de influenza pueden causar pérdidas considerables en las industrias de manejo de aves de corral, cerdos y caballos (M. I. Nelson & Vincent, 2015)

Las aves acuáticas son el reservorio primario de los virus de influenza y éstas son capaces de infectar gran variedad de aves y mamíferos. Debido al salto taxonómico es que se puede llegar a una pandemia que, a su vez, tendrá severas consecuencias para la población humana. El virus AH1N1pdm09, previamente llamado “de origen porcino” es un ejemplo reciente de un virus animal que adquirió el potencial biológico para infectar y causar enfermedad en humanos (M. I. Nelson & Vincent, 2015).

La pandemia más reciente fue causada por los virus de influenza A(H1N1) y el primer caso, confirmado por laboratorio, del brote de influenza de tipo porcino

apareció en México entre febrero y marzo de 2009. Los casos detectados en California a finales de marzo se confirmaron a mediados de Abril del mismo año. Durante las primeras semanas de vigilancia, el virus se diseminó a 30 países mediante transmisión humano-humano, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) elevó la alerta pandémica a nivel 6; la pandemia de 2009 presentó una emergencia de salud pública de alcances inciertos (Shinde et al., 2009; Smith et al., 2009)

La red de vigilancia global de influenza de la OMS detectó, identificó, caracterizó y monitoreó el curso de la pandemia oportunamente; la OMS proporcionó asistencia rápida a los países afectados y distribuyó más de 3 millones de tratamientos antivirales a 72 países. Anticipando una posible pandemia, antes de 2009, las autoridades de Salud Pública se habían enfocado en la influenza aviar H5N1 y en encontrar una señal característica entre los casos reconocidos de influenza H5N1 en humanos ya que la mortalidad por esta infección excede el 50%. Por lo tanto, se esperaba que un nuevo virus con capacidad pandémica causara muchas muertes así como la enfermedad generalizada, y en este sentido, la OMS ya estaba preparada para la pandemia (Fineberg, 2014).

Pandemia de 2009

En abril 25 de 2009 la OMS declaró estado de emergencia internacional y, para el 29 del mismo mes se aumentó la fase de pandemia por influenza al nivel 5, ya que se dio la transmisión humano-humano. Esta nueva fase de emergencia por infección no se había presentado desde la pandemia por influenza A (H3N2) de 1968. En junio se elevó la alerta pandémica a nivel 6, ya que la transmisión viral tuvo lugar en más de una región del mundo (Smith et al., 2009; WHO, s/f). Los casos de infección se caracterizaron por síntomas similares a los de influenza estacional como tos, dolor de garganta, rinorrea, dolor de cabeza y mialgia; en algunos casos también se presentó diarrea y vómito los cuales no son típicos de influenza estacional. Para el 18 de Mayo de 2009 ya habían 8829 casos confirmados en 40 países, de estos casos 74 resultaron en muerte. Lo más inquietante era que los pacientes, en más del 60%, eran de 18 a 25 años de edad o más jóvenes lo cual sugiere que este

grupo de edad es más susceptible a la infección por AH1N1 2009 que los adultos mayores. Se cree también que las personas adultas mayores pudieron tener algún nivel de protección contra esta nueva variante de influenza proporcionada por exposición previa a otros virus de influenza AH1N1 (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009).

La epidemia evolucionó rápidamente, el número de casos aumentó y para el primero de agosto de 2010 el número de muertes llegó a 18,449. La emergencia de la nueva variante de influenza AH1N1 en Abril 2009, promovió que en los centros de salud y los laboratorios clínicos se llevaran a cabo la identificación rápida y diagnóstico de los casos sospechosos además del monitoreo del esparcimiento de la infección por influenza. El proveer de cuidado médico y respuesta a la pandemia representó un gran reto para el cuerpo clínico y las instituciones de salud debido a la poca rapidez y precisión de la variedad de pruebas clínicas de diagnóstico disponibles, por lo que fue necesario realizar pruebas de diagnóstico molecular basadas en el análisis de la información de genoma completo disponible del virus de influenza no tipificado (Fineberg, 2014).

Desde Diciembre de 2005 se habían registrado 12 casos de infección esporádicos con influenza porcina AH1, diagnosticadas en EUA en personas que habían tenido contacto reciente con cerdos. El ensayo de PCR para detectar la HA de origen porcino fue validado por el CDC y usados para filtrar a los especímenes no sub-tipificados (Shinde et al., 2009).

Para el 15 de Abril de 2009 el CDC recibió una muestra proveniente de un caso de infección de un niño que presentó enfermedad parecida a influenza (confirmada por CDC 5 target PCR como influenza A no sub-tipificada), la muestra fue caracterizada como nueva influenza A por PCR con base en la línea de origen porcino, ya que cumplía con la firma obtenida en 2005. La secuenciación de esta variante viral se completó el 16 de Abril de 2009 y reveló que era un nuevo virus de influenza AH1N1 que, como ya se mencionó antes, tenía una nueva combinación de segmentos que no habían sido reportados en influenza humana o porcina (Garten et al., 2012; Shinde et al., 2009).

Después de la emergencia de la pandemia, el CDC puso a disposición de la red de vigilancia epidemiológica de influenza el ensayo por PCR para su detección, conocido como Panel de Detección de Virus de Influenza Porcina por RT-PCR en Tiempo Real (CDC pH1N1 PCR), liberado por la FDA y autorizado para su uso el 27 de Abril de 2009 (Shu et al., 2011).

El CDC pH1N1 PCR incluye 4 sondas de oligonucleótidos iniciadores, influenza A universal (InfA), influenza A porcina (swInfA), H1 porcina (swH1) y RNsa P (RP); diseñados para detectar y caracterizar a los virus de influenza AH1N1 de 2009. El ensayo está diseñado para que InfA, swInfA y swH1 resultaran positivos y así detectar AH1N1 pandémica de 2009. La sonda swH1 está diseñada para detectar específicamente el gen HA de la influenza porcina clásica, al triple re-arreglante así como AH1N1 de 2009 y específicamente diferenciar a esta de la influenza estacional.

Las sondas se diseñaron a partir de las secuencias disponibles en el GeneBank del Centro Nacional para Información Biotecnológica y los Institutos Nacionales de Salud (NCBI-NIH), la base de datos de influenza de los Laboratorios Nacionales Los Alamos (LANL) y de la Iniciativa Global de Distribución de Datos de la Influenza Aviar (GISAID)(Shu et al., 2011).

Fue de suma importancia conocer la secuencia del genoma viral de este nuevo virus para poder desarrollar una prueba diagnóstica que fuera accesible, rápida y confiable, ya que se pudieron sintetizar iniciadores específicos para la HA de este nuevo virus, una situación que era de mucha importancia durante el brote de 2009. Esto a su vez permitió rastrear los casos nuevos de infección, contabilizarlos y así realizar análisis de filogenia y mapas de distribución de la infección, que permitieran conocer los alcances de este nuevo brote de influenza. Estos datos eran necesarios para la toma de decisiones en cuanto a la clasificación pandémica de la infección. La información proporcionada permitió a los servicios e instituciones de salud proveer atención clínica oportuna y tratamientos dirigidos de mayor eficacia a los pacientes que presentaron la infección.

Debido a los cambios y evasiones antigénicas provistas por las mutaciones y los re-arreglos que sufren los virus de influenza, es necesario mantener actualizada la información acerca de estos nuevos cambios, y es por medio de la secuenciación que se puede llevar a cabo tal tarea; así las pruebas de diagnóstico no caerán en la obsolescencia y las vacunas contra estos virus serán adecuadas y actualizadas constantemente.

Epidemiología

Generalmente se ha considerado a la influenza como una enfermedad moderada en población pediátrica, joven y adulta no inmuno-comprometida, pero también es la responsable de la muerte de adultos mayores y pacientes inmuno-comprometidos. Las propiedades antigénicas de la influenza están determinadas por la HA y la NA. La HA une al virus a la célula hospedera y lo fusiona a la membrana celular, esta proteína es sintetizada como un péptido sencillo que es degradado por proteasas específicas del hospedero para originar HA1 y HA2. Los aminoácidos que se encuentran en el sitio de corte son importantes para determinar el grado de virulencia de los virus, que son más virulentos si estos aminoácidos son lipofílicos. La inmunidad inducida por la HA incrementa la resistencia a influenza por parte del hospedero y reduce la probabilidad de padecer una infección severa. Sin embargo esta protección no es efectiva contra nuevos virus emergentes que contienen variantes originadas por *antigenic drift* y *shift*. Por su parte la NA remueve la unión de la HA al ácido siálico para facilitar la liberación de los virus y su propagación para infectar nuevas células, además es la proteína blanco para los fármacos antivirales como oseltamivir y zanamivir (Van Den Dool, Hak, Bonten, & Wallinga, 2009; Yoo, 2011).

Mantener la vigilancia provee las bases para la selección de subtipos virales que puedan ser incluidos en la formulación anual de vacunas contra la influenza (WHO, s/f). Hasta ahora se han presentado 4 pandemias por influenza, siendo la más reciente la de 2009, la cual propició la aplicación de nuevas plataformas de diagnóstico y vigilancia epidemiológica.

Los datos obtenidos mediante secuenciación del genoma viral constituyen la base de información fundamental para llevar a cabo estudios de filogenia molecular; éstos estudios permiten llevar a cabo análisis acerca de cómo se relacionan evolutivamente los diferentes brotes virales, además de proveer información acerca de los posibles mecanismos de propagación de los nuevos tipos virales.

Filogenia molecular

Por otra parte, la filogenia molecular es el estudio de las relaciones evolutivas entre los organismos, en específico, la filogenia molecular se basa en el uso de secuencias de DNA y proteínas u otros marcadores moleculares para encontrar distancias genéticas entre dichos organismos. Ésta rama de la filogenia es muy importante principalmente porque existen organismos y, en este caso virus, con relaciones filogenéticas difíciles de evaluar.

El objetivo de los estudios filogenéticos es reconstruir los vínculos genealógicos entre entidades biológicas, para estimar el tiempo de divergencia entre organismos y registrar la secuencia de eventos a lo largo de los linajes evolutivos (Graur & Li, 2000).

Los estudios filogenéticos se representan por árboles filogenéticos o dendrogramas, gráficas compuestas por nodos y ramas; donde se representan unidades taxonómicas, nodos y la relación entre las unidades taxonómicas en términos de ancestría, las ramas; el patrón de las ramas da como resultado la topología.

Los modelos y métodos filogenéticos están definidos por la tasa de sustituciones y si éstas son transiciones o transversiones; el modelo HKY que es el utilizado en éste trabajo se seleccionó por su capacidad de distinguir las transiciones de las transversiones, dentro de un método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) (Hasegawa, Kishino, & Yano, 1985). El método de *máximum likelihood* permite utilizar distintas tasas de evolución y considera a cada sitio de la secuencia como informativo, además la evaluación de cada sitio es estadísticamente independiente. El método asume que después de un evento de especiación dos linajes evolucionaran de forma independiente y que el mismo proceso estocástico de

sustitución de bases aplica para todos los linajes (Felsenstein, 1981). La desventaja del método es el requerimiento computacional del que depende.

Secuenciación del genoma completo en la vigilancia epidemiológica

A pesar de que la gran cantidad de datos acerca de la evolución molecular del virus de influenza que hay, no se ha definido cómo el genoma completo de Influenza A ha evolucionado durante las epidemias. Los análisis filogenéticos han revelado que 18 codones en el dominio de HA1 tienen sustituciones no sinónimas que constituyen la firma de *antigenic shift* selectiva (Bush, Bender, Subbarao, Cox, & Fitch, 1999) y así como se ha hecho análisis de HA, con ayuda de las tecnologías de secuenciación se puede llegar a conocer la historia evolutiva del resto de los segmentos del genoma viral que son igualmente importantes.

El seguimiento y vigilancia epidemiológica y molecular de la influenza AH1N1 de 2009 es de gran importancia ya que este virus es capaz de generar epidemias y pandemias debido a su tasa de mutación y distribución alrededor del mundo; por lo tanto, es necesario continuar con la caracterización a nivel de secuencia de genoma completo de un mayor número de cepas virales presentes durante el episodio pandémico y en los rebotes. También es necesario definir la relación entre la infección por diferentes cepas y sus cursos clínicos específicos para filtrar los casos debidos a las características propias del virus y a las particulares de los hospederos.

Ésta caracterización surge de la capacidad de los virus de influenza A de experimentar transformaciones antigénicas y así re-emerger en la población humana y es a través de los cambios genéticos como los virus esquivan la respuesta inmune y esporádicamente, generan pandemias como la de 2009. El conocimiento actual sobre los virus de influenza proviene del análisis de los 8 segmentos virales por separado, pero hacerlo de manera conjunta puede proveer una visión más amplia de la evolución de los virus de influenza AH1N1pdm09.

Los eventos de cambio de hospedero, el desarrollo de pandemias, la generación de nuevos linajes virales por mutación y re-arreglos han demostrado ser evidencia que sugiere que los estudios filogenéticos y mutacionales a nivel de genoma completo

de los virus de influenza, en el caso de éste estudio de influenza AH1N1pdm09, son necesarios para generar datos robustos para detectar el surgimiento de nuevos eventos epidémicos y sus orígenes evolutivos.

HIPÓTESIS

El análisis de secuencia de genoma completo de muestras de virus AH1N1 provenientes del episodio pandémico del 2009, así como de rebrotes, permitirá evaluar la evolución del genoma viral, así como identificar mutaciones particulares que impacten aspectos clínicos específicos, como la patogenicidad y el reconocimiento antigénico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la caracterización molecular de los virus de influenza AH1N1pdm09 prevalente en México durante las temporadas de invierno 2012-2014

Objetivos Específicos

- Implementar la tecnología de secuenciación masiva en paralelo y por micro-arreglos para el análisis del genoma completo del virus AH1N1 2009.
- Obtener la secuencia del genoma completo del virus AH1N1 2009 a partir de 50 muestras clínicas.
- Determinar la presencia de mutaciones de relevancia clínica en el genoma del virus de la influenza AH1N1pdm2009.
- Identificar las relaciones filogenéticas de los 8 segmentos virales provenientes de las muestras clínicas secuenciadas

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención y tipificación de las muestras clínicas

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) se colectan rutinariamente muestras clínicas de pacientes que presentan enfermedad tipo influenza, esto se hace mediante hisopados nasofaríngeos y

aspirados bronquiales. Estas muestras clínicas se tipifican usando *primers* específicos para influenza H3N2, B y AH1N1pdm09. La tipificación se hace durante la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa en tiempo real (rRT-PCR) y de acuerdo a los lineamientos proporcionados por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Por ser el virus AH1N1pdm09 de nuestro interés, utilizamos sólo las muestras clínicas en las que se confirma la presencia de este virus. Se colectaron 50 muestras clínicas, de 50 pacientes, positivas para AH1N1pdm09, de las cuales se lograron secuenciar 23 a nivel de genoma completo. Los genomas virales fueron obtenidos directamente de las muestras clínicas de hisopados nasales; no se hicieron cultivos virales previos a la secuenciación.

Para aislar y purificar el RNA de los virus de influenza AH1N1pdm09, a partir de 200ul de muestra, usamos la técnica de extracción por filtración en columnas Invisorb para muestras provenientes de hisopos nasales, (Invisorb spin virus mini kit, Cat No.1040300200).

Extracción de RNA, reverso-transcripción y amplificación de cDNA

La extracción del genoma viral de influenza AH1N1pdm09 se hizo a partir de las muestras clínicas de hisopado nasal de los pacientes del INER, mediante columnas de extracción Invisorb (Invisorb spin virus mini kit, Cat No. 1040300200).

Secuenciación del genoma viral

De las 50 muestras procesadas, se obtuvieron 23 secuencias de genoma completo; 13 fueron secuenciadas usando micro-arreglos de alta densidad de oligonucleótidos y 10 muestras fueron secuenciadas usando secuenciación masiva en paralelo; 4 muestras fueron secuenciadas usando ambas tecnologías. Adicionalmente, se secuenciaron parcialmente 4 muestras de las que se obtuvieron secuencias de algunos de los genes, tal es el caso de las muestras **INMEGEN-INER 1** (NP, M, NS); **INMEGEN-INER 7** (PB2, NP, M, NS); **INMEGEN-INER 16 y 17** (todos los segmentos excepto HA).

Arreglos de re-secuenciación

Los RNAs positivos para influenza AH1N2pdm09 se retro-transcribieron con el kit de enzimas de alta fidelidad SuperScript III (SuperScript III First strand synthesis system for RT-PCR, Cat No. 18080-051) de Invitrogen y *primers* patentados de *Biosurveillance Resequencing Oligo Kit* (AITbiotech, AITBH1N1M-50) del Instituto de Genómica de Singapur.

Posteriormente se usó una alícuota de 2ul del cDNA resultante de la RT, para hacer la amplificación de los 8 segmentos del genoma viral, mediante PCR con enzimas polimerasas Platinum Taq DNA (Platinum Taq DNA polimerasa Cat No. 10966-034, Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) y *primers* incluidos en el kit de re-secuenciación. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron 94° C, 2min; 40 ciclos (94° 30 s, 66° C 3 min); 72° C 5 min.

El genoma completo de los virus, provenientes de las muestras clínicas, se obtuvo mediante secuenciación con micro-arreglos para resecuenciación de virus de influenza A H1N1pdm09 GIS H1N1 (Flu BioSurveillance Array Nimblechip 132k Roche) y con secuenciación masiva en paralelo de la plataforma MiSeq de Illumina.

Cada una de las muestras fueron marcadas de forma independiente, después de la amplificación por PCR, con CY3 de Roche (Nimbelgen One-color DNA Labeling Kit, REF 05 223 555 001). La hibridación de las muestras sobre los micro-arreglos se hizo utilizando el kit de hibridación de Roche, siguiendo las recomendaciones del fabricante, (NimbleGen Hybridization Kit, REF 05 583 683 001). Finalmente se hibridaron 800ng de cDNA marcado sobre el microarreglo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los micro-arreglos se encuentran impresos en laminillas tipo portaobjetos, 12 micro-arreglos por laminilla; y se escanearon en el equipo GenePix 4000b (molecular devices) con el objetivo de obtener las imágenes de cada micro-arreglo y procesarlas con el software NimbleScan (Roche), esto para traducir la intensidad de fluorescencia en nucleótidos y así obtener la secuencia en archivos tipo FASTA.

Secuenciación Masiva en Paralelo

Los 8 segmentos virales se amplificaron simultáneamente y directamente de las muestras clínicas, usando *primers* MBTuni12 y MBTuni13, como se describió anteriormente (Zhou et al., 2009). Los productos de amplificación de 10 muestras se purificaron previamente usando el kit QIAquick (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN, Valencia, CA). Las librerías de código de barras para NGS se produjeron usando *Nextera XT DNA library preparation kit paired-end sequencing (2x250 cycles)* was performed using the MiSeq platform (Illumina). Las lecturas se mapearon usando *A/California/07/2009(H1N1)/2009(H1N1)* como referencia, los datos fueron obtenidos de NIAID *Influenza Research Database (IRD)* usando SMALT V.0.7.6. El ensamblaje se hizo con Velvet V1.2.10 y visualizado con TABLET V 1.15.09.01. Se alcanzó el 100% de cobertura para cada virus, con al menos 90 de profundidad para los segmentos HA, NS, NA, M y NP (cobertura media: 10) Los segmentos PA, PB1 y PB2 tuvieron 80% de cobertura >10x. Las secuencias de este estudio se depositaron en la NIAID IRD (www.fludb.org) y están disponibles en GenBank (Anexo Tabla A1)

Análisis de Mutaciones

Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos de *A/California/07/2009(H1N1)/2009* y se compararon con las secuencias mundiales depositadas en *Fluserver* desde 2009 a 2016, el análisis se hizo para cada uno de los ocho segmentos virales, con el objetivo de identificar nuevas sustituciones y determinar cuántas veces han sido reportadas previamente. Para poder hacer el análisis comparativo las secuencias se alinearon en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6.0; (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013), por el método Clustal W. Las sustituciones encontradas se organizaron con base en el gen, el año de detección y reportes previos.

Análisis de sitios antigénicos de HA

El análisis de la sustituciones en HA se hizo con base en la secuencia *A/California/07/2009(H1N1)/2009*, usada como referencia, esto con el fin de establecer

los cambios nuevos en los sitios antigénicos o en las posiciones cercanas para las muestras secuenciadas de los años 2012 a 2014. Las sustituciones se obtuvieron por búsqueda manual en los alineamientos construidos en MEGA 6

Filogenia

Para hacer el análisis filogenético se seleccionaron las secuencias completas para todos los segmentos de virus de influenza humana H1N1 reportados entre 2011 y diciembre 31 de 2014 en IRD, incluyendo genomas que tuvieran todos los segmentos correspondientes. Se incluyeron las 10 secuencias de genoma completo (203-2014) de este estudio para el análisis de los 8 segmentos virales y 20 secuencias de PB2, 18 de PB1, 17 de PA, 20 de HA, 21 de NP, 18 de NA, 27 de M y 23 de NS obtenidas de muestras clínicas colectadas durante 2011 y 2012; 12 de estas muestras tienen datos de secuencia de genoma completo.

Para el análisis filogenético se hicieron alineamientos en Multiple Sequence Comparison by Log_Expectation (MUSCLE (Edgar, 2004)) y fueron editados en MEGA 6. Se construyeron árboles filogenéticos por el método de Máxima verosimilitud para cada segmento viral usando PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) bajo el modelo de HKY85 y se validaron mediante el uso de bootstraps de 1000 replicados. En total se utilizaron 20 secuencias de PB2, 18 de PB1, 17 de PA, 20 de HA, 21 de NP, 18 de NA, 27 de M y 23 de NS provenientes de las muestras clínicas de 2012 a 2014; 12 de dichas secuencias son de genoma completo. También se utilizaron todas las secuencias de genoma completo provenientes de México depositadas en IRD desde el 2009 hasta el 2014 y del resto del mundo las secuencias depositadas desde 2010 hasta 2014; como secuencia de referencia se utilizó A/California/07/2009 (CY121681). Finalmente los árboles filogenéticos resultantes se editaron en FigTree ("FigTree", s/f) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

Resultados

La media de edad de los pacientes fue de $45,4 \pm 20,8$ años y el 76,4% de estos individuos eran varones. El índice de masa corporal, (IMC) medio (kg / m²) fue de

29,2 y el 23,5% requirió ventilación mecánica en promedio durante 15.2 días. Los pacientes tenían 22 días de hospitalización, 17,6% tenían comorbilidades como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y el 5,8% de estos pacientes fallecieron. Los pacientes que requirieron ventilación mecánica mostraron el índice de Kirby (PaO_2 / FiO_2) promedio de 104.7. Los principales signos y síntomas al comienzo de la enfermedad incluyeron fiebre, mialgia, tos y dolores de cabeza, mientras que dolor torácico, disnea y cianosis ocurrieron después del tercer día. Los pacientes gravemente enfermos recibieron oseltamivir (150 mg / día) durante el período mientras estaban bajo ventilación mecánica, mientras que los pacientes no críticos recibieron 150 mg / día de oseltamivir durante 5 días (tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes

Variable	Pacientes A/H1N1
Edad promedio ($X \pm DE$) (años)	45.46 \pm 20.8
Género Masculino (%)	76.4
IMC (Kg/m^2) $X \pm DE$	29.2
Ventilación mecánica (%)	23.5
Promedio de ventilación mecánica (días) Media + DE	15.2 +
Hospitalización (días)	22 \pm 8
Co-morbilidades* (%)	17.6
Defunción (%)	5.8

Los datos son medias \pm desviación estándar (DE), o número y porcentaje. * 2 pacientes tenían asma y 1 EPOC.

Sustituciones detectadas mediante secuenciación de genoma completo de virus de influenza AH1N1 09pdm

Las sustituciones observadas en todo el genoma del virus pandémico A/H1N1 se clasificaron por segmento viral, año de aislamiento y descripción de la mutación (tabla 2). El análisis de las secuencias para cada uno de los ocho segmentos víricos se realizó usando la secuencia de aminoácidos de la cepa A/California/07/2009(H1N1)/2009 como referencia y comparando secuencias globales en FluSurver de 2009 a 2016. Se muestran las sustituciones detectadas para cada uno de los 8 segmentos víricos correspondientes a los genes virales (HA, NP, NA, M1 / M2, NS1 / NS2, PB2, PB1 y PA), el año correspondiente de detección (azul claro para 2011-2012 y azul oscuro para 2013-2014), y su potencial efecto biológico.

Tabla 2. Sustituciones observadas en los virus pandémicos de A/H1N1, clasificados por segmento, año de circulación y descripción

Gen	Sustitución	Efecto Biológico	Número de veces Reportado	Referencia**
PB2	T76I	Sin caracterizar	14	
	G128C	Sin caracterizar	2 (Reportado previamente ^o)	
	V227A	Sin caracterizar	3 (Detectado por primera vez en México)	
	R591P	Virulencia, replicación efectiva	Reportado por primera vez	(28)

	V613A	Cambio en la especificidad del huésped	3	(28), (37)
	V640M	BSL*	Reportado por primera vez	(34)
	G644R ^a	BSL/VOI	4	(28), (46)
	T676I ^a	Adaptación	12	(17)
PB1	Q569K	Sin caracterizar	Reportado por primera vez	
	S704T	Epítipo presentado por MHC a Células T	Reportado por primera vez	(29), (30)
	G154A	Sin caracterizar	Reportado por primera vez	
	E177Q	Sin caracterizar	Reportado por primera vez	
	E178K	Sin caracterizar	4	
	M339T	Sin caracterizar	2 (Reportado 1 vez previa°)	
PA	L109F	BSL	Reportado por primera vez	(32), (33)
	T151N	BSL/VOI	5	
	T162P	VOI*	Reportado por primera vez	
	E623D	BSL/VOI	3	(47)
	I13V ^a	VOI	16	(38)

	F35L	BSL	12	(41)
	E298K	Sin caracterizar	9	
HA	H25R	BSL/VOI/BHP/ Reconocimiento de Ab's*	2 (Reportado 1 vez previa°)	(43)
	E373G	BSL/VOI/ Reconocimiento de Ab's	19	(42), (43)
	V7I ^a	Sin caracterizar	22	
NP	E11G	Sin caracterizar	Reportado por primera vez	
	A27V	Sin caracterizar	2 (Reportado 1 vez previa°)	
	Y281C	Sin caracterizar	Reportado por primera vez	
	G356R	VOI/BNA*	Reportado por primera vez	(35)
	S482N	VOI	10	
NA	I122V	Sin caracterizar	11	
	V177I	BSL/VOI	4	(45)
	D199N	Antigenic drift/Reconocimiento de Ab's	30	(44), (45)
	R220G	VOI/ Reconocimiento de Ab's	13	(45)

	Q308L ^a	Sin caracterizar	6	
	T452I ^a	BSL/BHP*	18	(49)
M1	G18S	VOI	2	(31)
	N207S	Sin caracterizar	11	
	A33T	VOI	6	(31)
	M165L	Sin caracterizar	2 (Reportado anteriormente ^o)	(31)
M2	E16A	Cambio en la especificidad del huésped	Reportado por primera vez	
NS1	G45R	BNA	10	(50)
	A122T	VOI	18	(39), (40)
	L36I ^a	BSL/VOI	6	(48)
	Q63K	BSL/VOI	Reportado por primera vez	(48), (36)
	S74N	BSL/VOI/BHP	11	(48), (40)
	N127S ^a	BSL/VOI	5	(48)
	L185F	Sin caracterizar	9	

^oEstos datos se obtuvieron sometiendo secuencias FASTA a FluSurver

* Abreviaturas: BSL, unión a pequeños ligandos; VOI, interfaces de oligomerización viral; BHP, proteínas huésped de unión; BNA, ácidos nucleicos de unión; Ab, anticuerpos.

^a Dos o más secuencias

** Las anotaciones funcionales de sitios y mutaciones en la lista aquí no son puramente predecibles computacionalmente, sino que de hecho se basan estrictamente en experimentos

Éstas mutaciones están reportadas en (Arellano-Llamas et al., 2017)

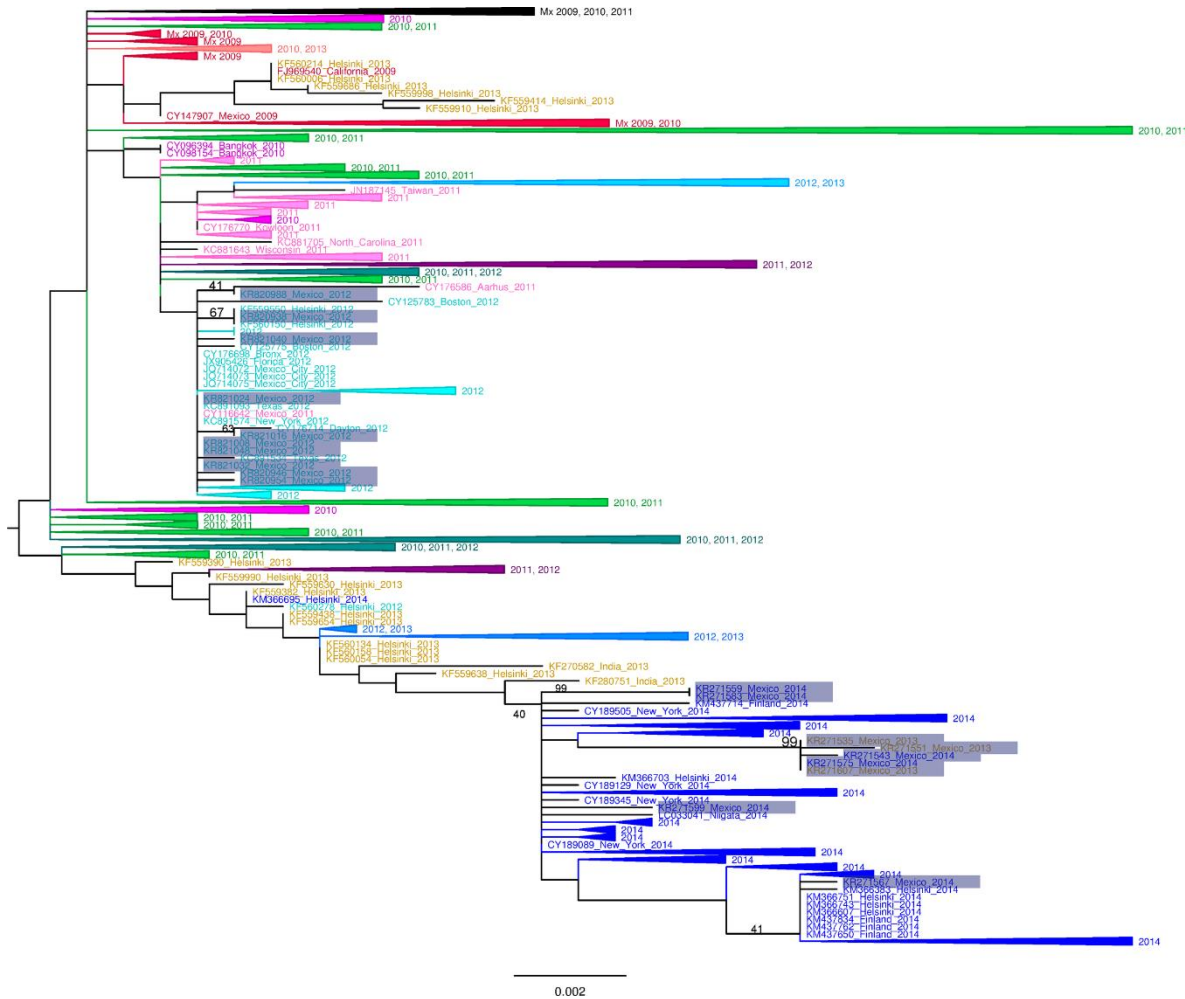
13 de las sustituciones que se identificaron son nuevas, y su papel biológico potencial no se ha definido. Las sustituciones que se han reportado anteriormente están implicadas en el cambio en la especificidad del hospedero, las interfaces de oligomerización virales (VOI), los ligandos pequeños de unión (BSL), el reconocimiento de anticuerpos (Ab), las proteínas de unión del hospedero (BHP), los ácidos nucleicos de unión y la deriva antigénica. Las VOI se calculan automáticamente a partir de estructuras conocidas y captan sitios tanto de oligomerización virales como en contactos de cristal. BHP incluye principalmente la interacción con las proteínas de respuesta inmune humana. BSL se deriva de ligandos pequeños vistos en estructuras cristalinas conocidas y, en el caso de proteínas de superficie de influenza, a menudo significa interacción con glicanos pequeños que pueden estar en o cerca de un sitio de glicosilación.

Análisis filogenético

Las secuencias de los segmentos HA, NP, NA, M y NS del virus pandémico colectados en la temporada de la influenza 2013-2014, se agruparon con las secuencias 2013-2014 de Nueva York, Helsinki y Washington. Sin embargo, el complejo de polimerasa se agrupó con muestras de 2010 y 2011. El análisis basado en el gen HA mostró que las secuencias mexicanas podían dividirse en 3 grupos: El Grupo 1 (KR271535, KR271543, KR271551, KR271575 y KR271607) tiene 5 secuencias que forman un grupo monofilético (bootstrap 99%, figura 3A). Estas secuencias mexicanas se agruparon junto a secuencias de HA de cepas de Nueva York (CY189313, CY189361, *bootstrap* 66%). Estas secuencias comparten dos sustituciones en el péptido de señalización de HA inmadura en los aminoácidos 7 y 15 (-11 V / I y -3 A / T). Las secuencias del Grupo 2 (KR271559 y KR1571583) se agruparon por separado y comparten una nueva sustitución en HA, H138Q. El Grupo 3 (KR271599 y KR271567) se agrupó con cepas aisladas en Nueva York, Washington y Helsinki. Un aislado (KR271567) compartió la mutación T474M con secuencias de Helsinki y Finlandia principalmente. Hemos mapeado las

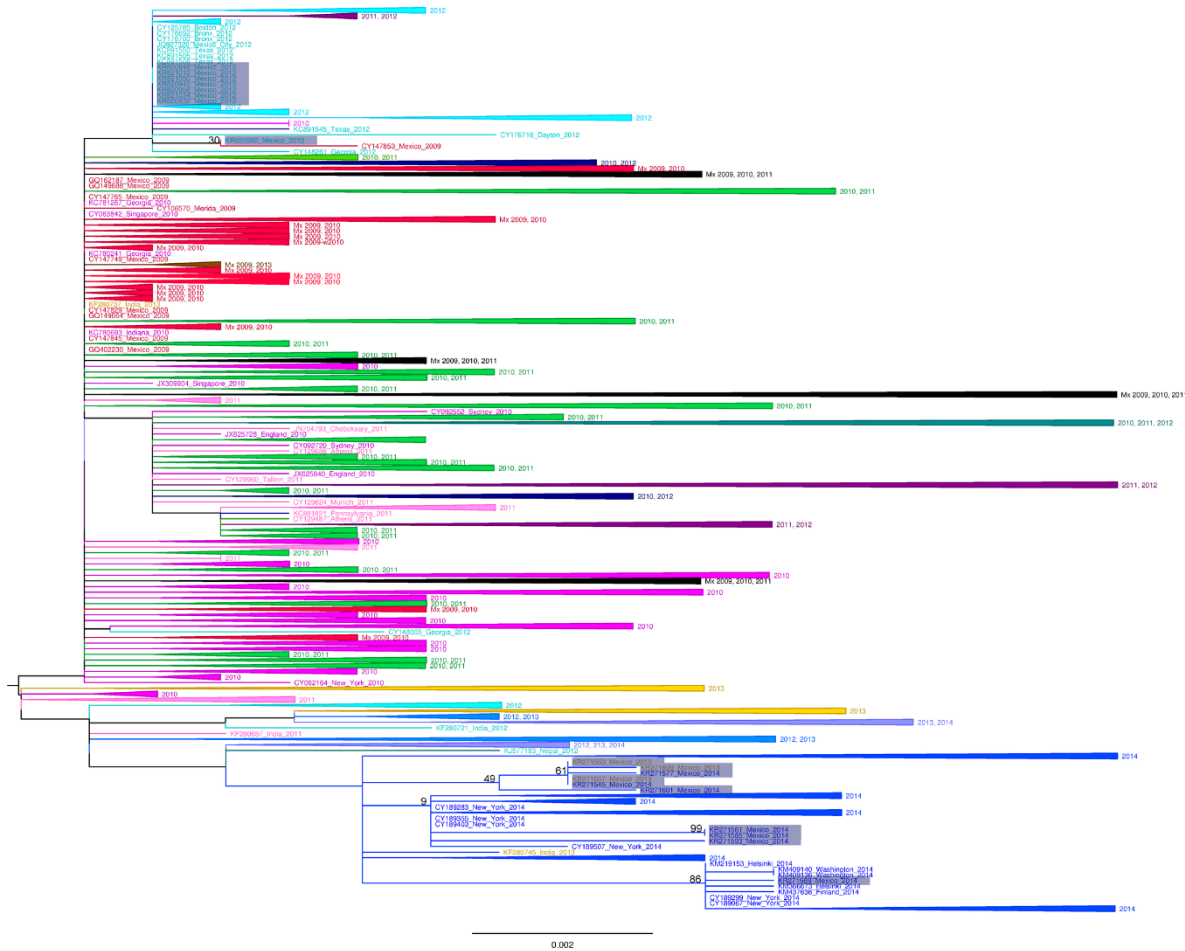
sustituciones de aminoácidos que se producen en los nodos de la filogenia de H1N1/2009 HA, mostrando cambios de aminoácidos en K163Q y A256T para secuencias de 2013-2014 como se mostró anteriormente. Además, un grupo de 2 secuencias mexicanas fue marcado por la sustitución H138Q. En cuanto a NA, observamos 3 sustituciones que marcaron secuencias de 2013-2014; I34V, I321V y K432E. Para determinar si los sitios individuales estaban bajo selección positiva, se utilizó el método de efectos mixtos modelo de evolución (MEME). Sólo I34V fue estadísticamente significativa ($P = 0,05$). Además, con análisis de HA, hemos encontrado sustituciones que distinguen a los tres grupos mencionados anteriormente. Observamos la sustitución Q308L en el grupo 1, mientras que T452I se encontró en el grupo 2 y las sustituciones N449K, N386K y S82P estuvieron presentes en la secuencia KR271569 en el grupo 3. Para NS1 se detectó la sustitución L36I en el grupo 1, la N127S en el grupo 2 y finalmente la sustitución K131E en el grupo 3. En cuanto a PA encontramos la sustitución I13V como firma del grupo 1 (estadísticamente significativa con $P = 0,05$), mientras que en el grupo 3 se detectaron dos sustituciones F35L e I459T. En PB1 asociamos la sustitución A374T con el grupo 2 y M646I con el grupo 3. En PB2 T676I se encontró en el grupo 2 (Li et al., 2009). Se encontraron otras sustituciones en M1, M2, NS2 y NP, pero fueron similares a las reportadas en otros países (tabla 2).

Figura 3A-H. Árboles filogenéticos Figura 3A árbol filogenético de HA



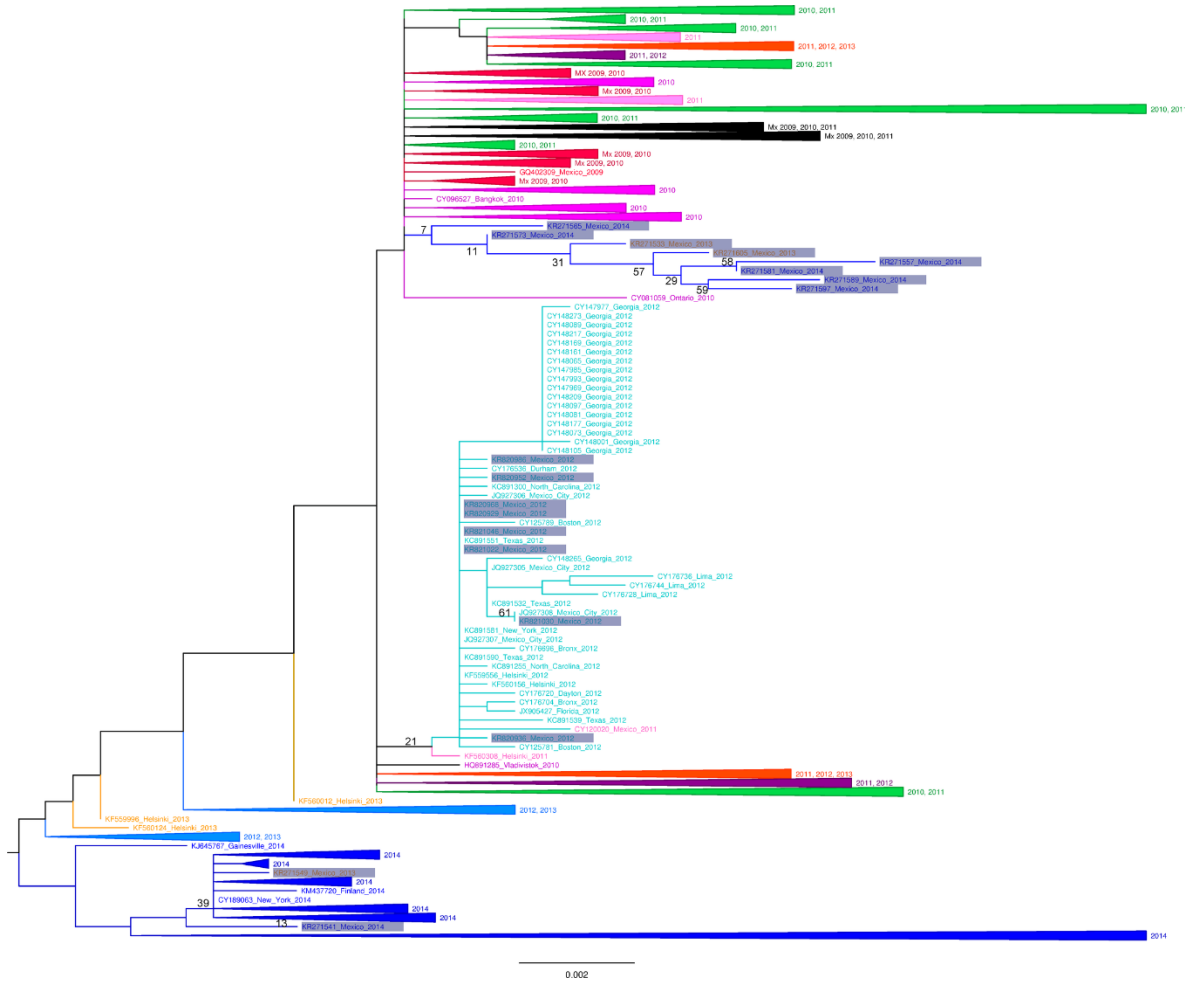
Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013; VIOLETA, 2013-2014.

Figura 3B árbol de NA



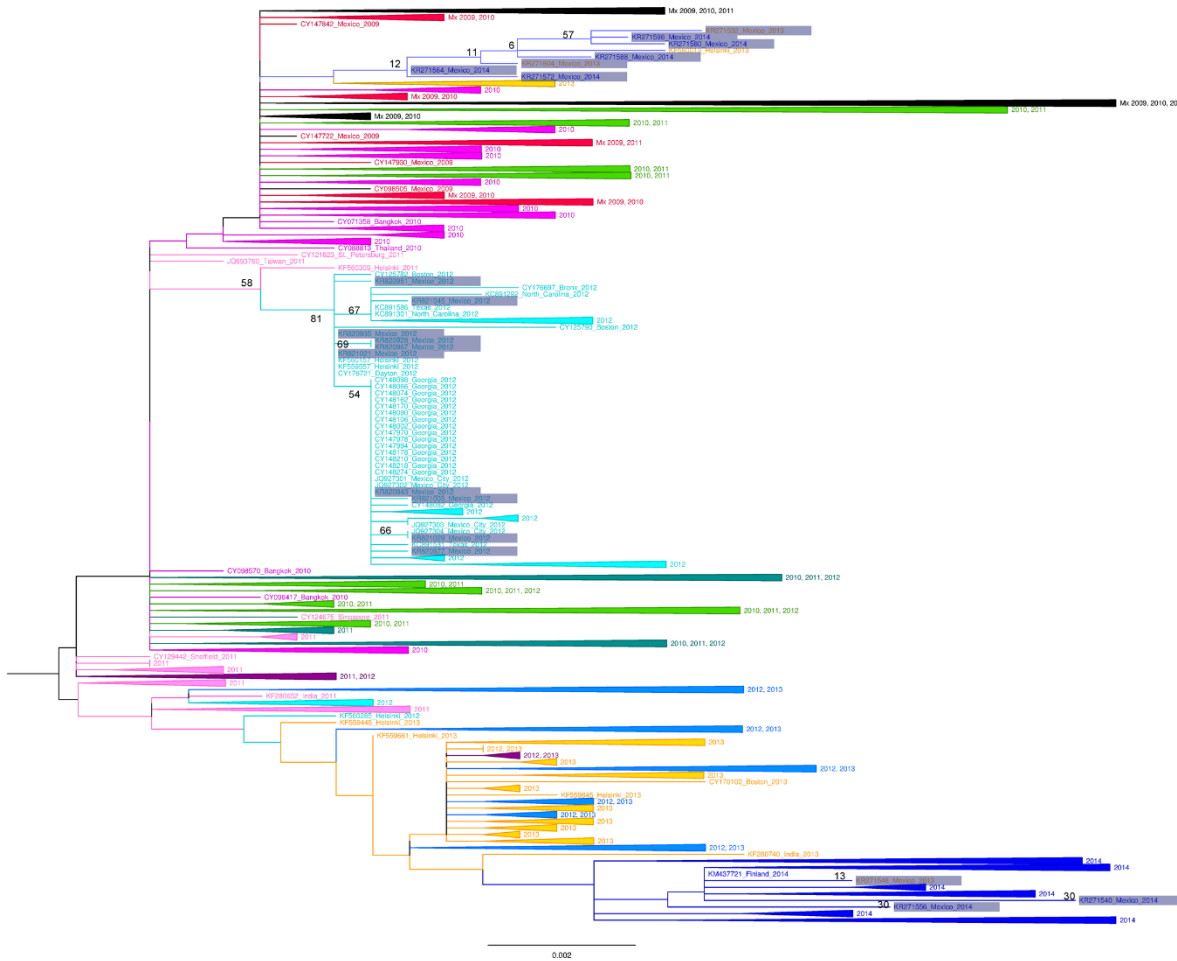
Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013; VIOLETA, 2013-2014.

Figura 3C árbol de PB1



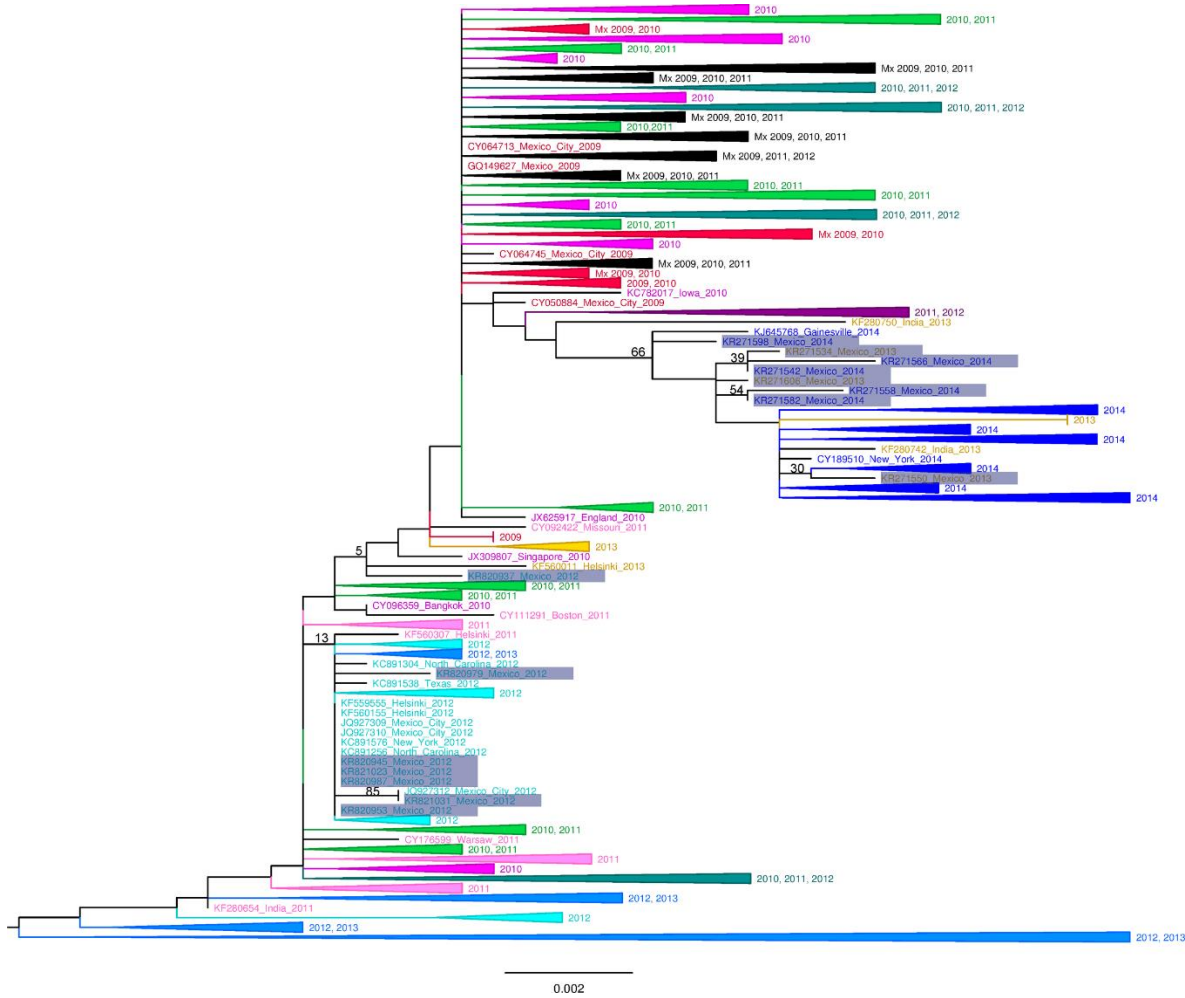
Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013;

Figura 3D árbol de PB2



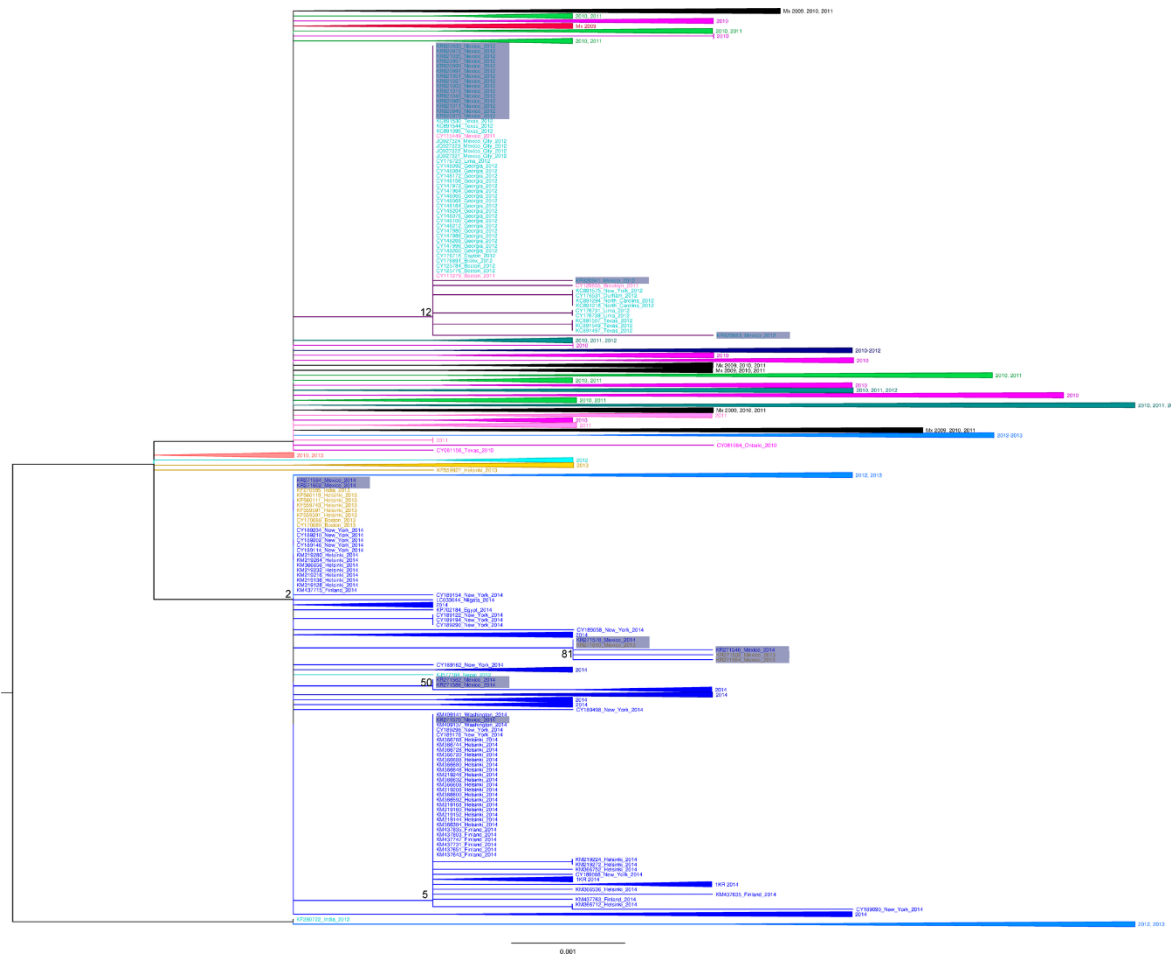
Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013;

Figura 3E árbol de PA



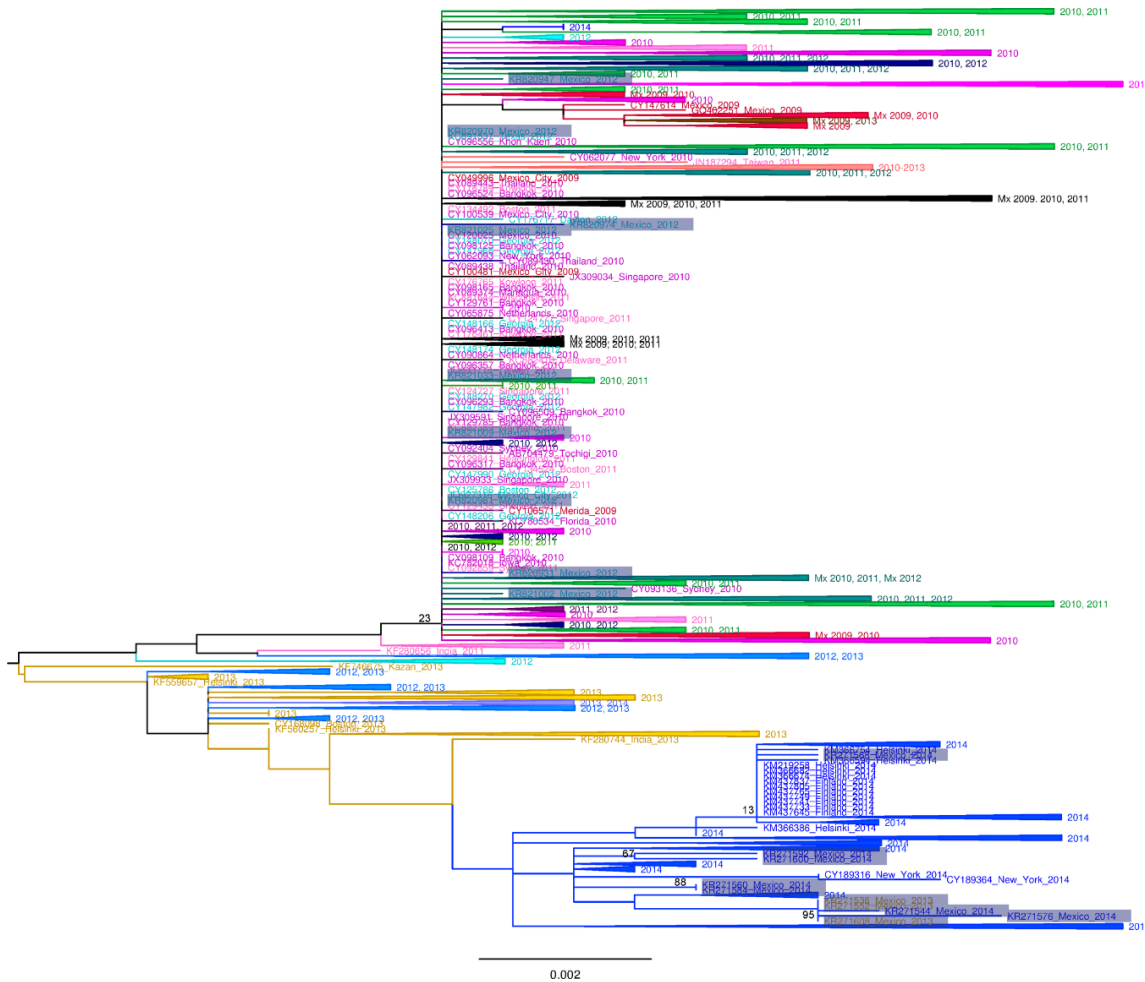
Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013;

Figura 3F árbol de M



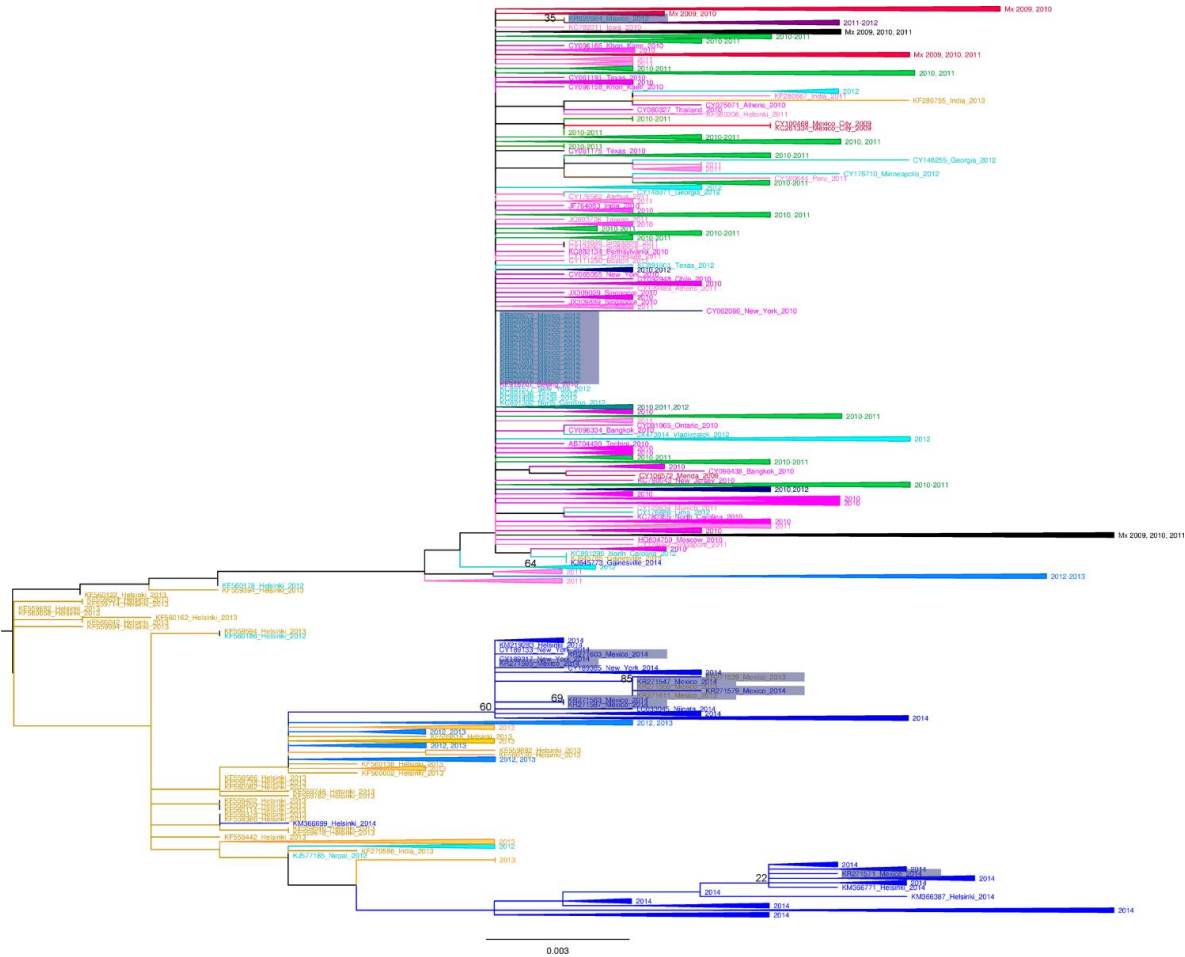
Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013;

Figura 3G árbol de NP



Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013;

Figura 3H árbol de NS



Colores para las temporadas:
 ROJO, 2009-2010; VERDE
 BRILLANTE, 2010-2011;
 PÚRPURA, 2011-2012; AZUL
 CIELO, 2012-2013;

Figura 3A-3H. Árboles filogenéticos de máxima probabilidad (ML) para los 8 segmentos del genoma de influenza.

Los árboles filogenéticos se construyeron a partir de 1200-1300 secuencias de virus A(H1N1)pdm09 virus depositados en GenBank de 2009 a 2014 con 1.000 réplicas *bootstrap*, para los segmentos indicados como se explica en la sección de Métodos. Los árboles filogenético incluyen 7-17 secuencias a partir de 2012 (PB2, 10, PB1, 8, PA, 7, HA, 10, NP, 11, NA, 8, M, 17 y NS, 17), 3 secuencias de 2013 y 7 secuencias a partir de 2014; obtenidos en este estudio. Los puntos rojos en los nodos muestran ramas con un *bootstrap* de 50% para las secuencias de 2014 descritas en este trabajo.

Colores para las temporadas: ROJO, 2009-2010; VERDE BRILLANTE, 2010-2011; PÚRPURA, 2011-2012; AZUL CIELO, 2012-2013; VIOLETA, 2013-2014.

Caracterización molecular de HA

El mapeo de las sustituciones de los sitios antigénicos de H1 mostraron diferentes patrones de cambio a través de las temporadas de invierno 2009-2014. Las sustituciones de HA S69T, S143G, A197T, N260D y V520A fueron las mutaciones dominantes durante 2011-2012 pero no en la temporada de influenza 2013-2014. Otras mutaciones se hicieron dominantes desde 2011-2012 (S185T, E374K, S451N y E499K) y permanecen hasta 2013-2014, además de estas sustituciones, K163Q, A256T y K283E fueron dominantes en el virus de influenza en México durante 2013-2014. Es importante destacar que se detectó la sustitución de H138Q, que se encuentra en la región antigénica Ca2 de HA, un sitio inmunogénico relevante (figura 4). Se predijeron seis sitios de glicosilación putativos en HA (Asn-Xaa-Ser / Thr) en las posiciones 28, 40, 104, 304, 498 y 557 utilizando NetNGlyc 1.0. Esto indica que los aislados mexicanos de 2013-2014 mantienen un patrón de glicosilación similar a California 2009.

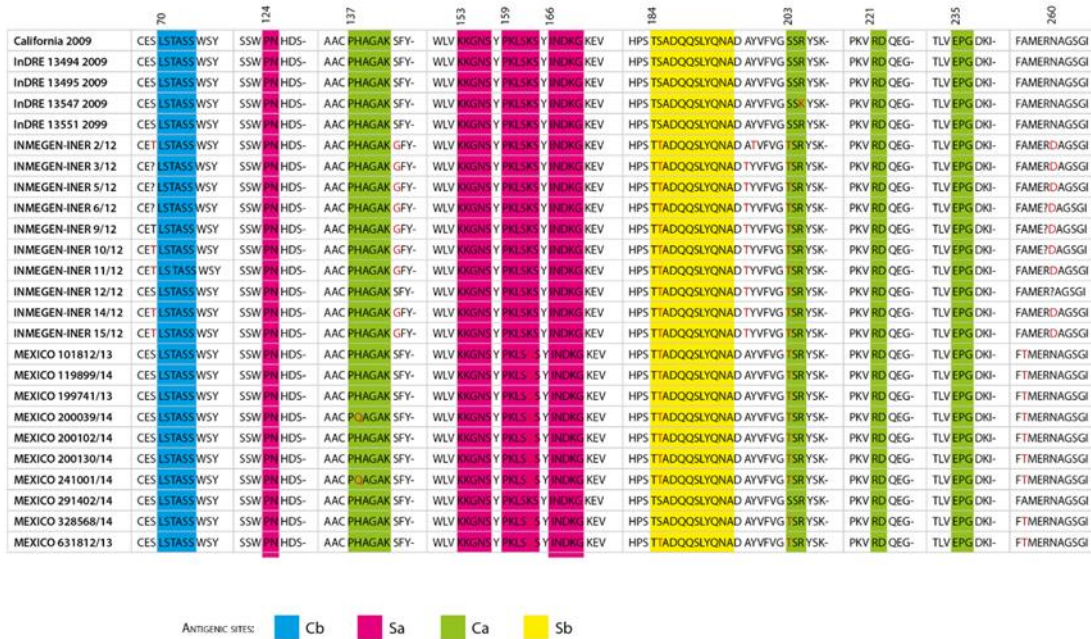


Figura 4: Análisis de las sustituciones detectadas en sitios antigénicos de HA o junto a ellos, obtenidos de aislados mexicanos de las temporadas 2011-12 y 2013-14. El análisis de las sustituciones en HA se realizó utilizando la secuencia California/07/2009 como referencia para establecer los cambios en los sitios antigénicos y en sus posiciones vecinas. Los sitios antigénicos están sombreados e identificados por colores. El azul es para el sitio Cb, el rosa es para el sitio Sa, el verde es para el sitio Ca y el amarillo es para el sitio Sb. Los aminoácidos en rojo representan los cambios detectados en las secuencias de aislados de 2011-12 y los blancos representan los cambios detectados en los aislados de 2013-14

Discusión

Los virus de la influenza A causan infecciones agudas en las vías respiratorias y representan una importante amenaza para la salud pública (Lapinsky, 2010). La cepa del brote de la infección por el virus de la gripe porcina A/H1N1 en 2009 sigue circulando durante la temporada invernal en muchos países y puede causar enfermedad pulmonar grave en individuos susceptibles (Perez-Padilla et al., 2009; Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1)2009 Influenza, 2010). Por lo tanto el análisis continuo del genoma completo de estos virus proporcionará la información comprensiva de su evolución

molecular para mantener medidas preventivas eficaces para la salud pública. Se ha demostrado ampliamente que el virus de la influenza A/H1N1 pandémico contiene una mezcla de segmentos, incluyendo HA, NP, PB1, PB2, PA y NS de un virus triple re-arreglante aislado en América del Norte y segmentos NA y M del virus de influenza porcina Eurasia (Babakir-Mina, Dimonte, Perno, & Ciotti, 2009; Garten et al., 2012).

Debido a la tasa de mutación diferencial de cada segmento viral, la vigilancia epidemiológica molecular es importante para detectar variaciones antigénicas entre las cepas circulantes de influenza, que pueden modificar la patogenicidad y los patrones de resistencia antiviral de estas cepas virales.

En este estudio se secuenció el genoma completo de la cepa pandémica A/H1N1pdm09 aisladas de pacientes en un hospital de referencia en la Ciudad de México (INER) en diferentes años y comparamos estas secuencias con secuencias consenso para detectar mutaciones que pudieran estar asociadas con la evolución viral o que pudieran influir en la antigenicidad del virus. Es importante mencionar que las secuencias se obtuvieron directamente de muestras clínicas, con el fin de evitar la selección artificial *in vitro*.

Encontramos una clara variación del virus en México desde la temporada 2011-2014 debido a diferentes marcadores y de acuerdo con informes previos (Elderfield et al., 2014; Mishel et al., 2015). Las mutaciones V344M e I354L de PB2 y N321K de PA, I397M, I435T de PB1, S498N de NP, N44S, V241L, N369K de NA V80I de M1, L90I de NS1 y S185T, S203T, E374K y S451N de HA (figuras 3 D, E, C, G, B, H y A) aparecieron juntas durante la evolución del virus de la influenza en México. Sin embargo, encontramos otras sustituciones únicas en PB2 G644R y T676I, PB1 A374T, HA H138Q, NA Q308L y L36I en NS1 de algunas cepas mexicanas que podrían indicar divergencia geográfica. Estos hallazgos deben confirmarse con más secuencias obtenidas en otras regiones del país. Recientemente un análisis muy extenso de las secuencias del virus de influenza en la etapa post-pandémica mostró que diferentes regiones geográficas generaron picos epidémicos locales y podrían actuar como una semilla potencial de virus local (Mukherjee et al., 2016). Se

necesitarían más estudios para determinar cuáles de ellos están fijados en la próxima generación del virus de influenza en México. Se sabe que los virus de influenza experimentan selección positiva durante el proceso de transmisión inter-especies y durante las etapas iniciales de un brote humano, seguido por la selección de purificación (negativa), cuando los virus se han adaptado al nuevo huésped humano durante el período tardío de la epidemia (S.M.E.C, 2004; Song et al., 2005; C.-Y. Zhang, Wei, & He, 2006), en éste contexto, todavía observamos selección positiva de sustituciones de NA I34V y PA I13V en la temporada de invierno 2013-2014 (figura 3B).

Nuestros datos indican que el complejo de polimerización parece tener diferente dinámica evolutiva (figuras 3 C, D y E); probablemente debida a diferencias en la tasa de evolución entre los segmentos virales. Esto también podría ser un reflejo de las diferencias en la presión de selección a la que se someten los virus una vez que infectan al huésped; con respecto al resto de los segmentos del genoma viral, todos los aislados mexicanos de la temporada 2013-2014 se agruparon con secuencias de Nueva York y Helsinki (figuras 3C, D y E) lo cual corresponde a lo observado en 2009 ya que para Nueva York se encontraron clados filogenéticamente distintos a los de México y California que además se distribuyeron en países europeos (Nelson et al., 2009). Es posible que los linajes virales se encuentren co-circulando y que se presenten reintroducciones de múltiples variantes y que además se generen distancias filogenéticas que deberán ser vigiladas.

Las secuencias mexicanas de 2013-2014 pertenecen al clado 6B caracterizado por las sustituciones D97N, K163Q, S185T, K283E y A256T (figura 3A). Sin embargo, también se observó otra rama del árbol con 2 secuencias con sustituciones específicas en todos los segmentos, incluyendo la sustitución H138Q, la cual se encuentra en el sitio antigénico de HA. Estos resultados sugieren que las cepas podrían aparecer temporalmente, con diferentes características moleculares y potencialmente con implicaciones antigénicas o patogénicas. Un cambio reciente y significativo se observó en los virus de 2013 a 2014, la sustitución K163Q, fue predominante desde esta temporada y hasta ahora; este cambio se ha asociado

con la interferencia en la unión de anticuerpos (Abs) observado en población de mediana edad en todo el mundo (Escalera-Zamudio et al., 2012).

En este estudio se identificaron 13 nuevas sustituciones con importantes efectos biológicos, entre ellos la virulencia, cambios en epítomos de células T presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y cambios potenciales en la especificidad del hospedero y debe señalarse que aunque estas mutaciones no han sido caracterizadas particularmente, se encuentran cerca o pertenecen a regiones de importancia biológica (Tabla 2).

La sustitución PB2-R591P se encuentra en una posición en la que R ha sido implicado en una replicación más eficiente de virus pandémicos H1N1 en mamíferos (Shinya et al., 2010), aunque el efecto de la prolina es desconocido. PB1-S704T es parte del epítomo H-2Kb y podría afectar la eficiencia del procesamiento del antígeno durante la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) (Belz, Xie, & Doherty, 2001; Meijers et al., 2005). E16A se encuentra en el ectodominio N-terminal de M2 en el exterior de la membrana viral cerca de los puentes disulfuro que conectan el tetrámero M2, pero su efecto específico aún no se ha caracterizado (Schnell & Chou, 2008).

Otras sustituciones novedosas en este informe están implicadas en VOI, tales como PA en la posición T162P (Kowalinski et al., 2012; Yuan et al., 2009); BSL en PB2 posición V640M (Ohtsu, Honda, Sakata, Kato, & Toyoda, 2002) y en PA en L109F (Kowalinski et al., 2012; Yuan et al., 2009); VOI/BNA en NP en G356R (Ye, Krug, & Tao, 2006) y BSL/VOI en NS1 a Q63K (Yin et al., 2007).

Con respecto a las sustituciones previamente observadas, se ha predicho computacionalmente que algunas están vinculadas a la especificidad de huésped, como PB2 V613A (Miotto, Heiny, Tan, August, & Brusica, 2008). Otros residuos incluyen VOI, I13V en PA (Zhao et al., 2009), S482N en NP (Ye et al., 2006); G18S y A33T en M1; A122T en NS1 (Das et al., 2008; Kerry et al., 2011), BSL, F35L en PA (Seyer et al., 2012).

Por otra parte, también se observó que algunas sustituciones podrían tener más de una función biológica, como HA H25R y E373G, que están implicados en el reconocimiento de Ab, BSL, VOI y BHP (Seyer et al., 2012; Wang, Suguitan, Zengel, Chen, & Jin, 2012; Yang et al., 2014). NA D199N también está asociado con la deriva antigénica (Colman, Hoyne, & Lawrence¹, 1993; Gulati et al., 2002); BSL/VOI en PB2 G644R (Hayashi, Wills, Bussey, & Takimoto, 2015); PA T151N y E623D (Kowalinski et al., 2012; Obayashi et al., 2008; Yuan et al., 2009); NA, V177I (Colman et al., 1993); NS1, L36I, Q63K, N127S (Carrillo et al., 2014; Kerry et al., 2011). BHP en NA T452I implicado en BSL (N. Zhang et al., 2011) y en NS1 S74T (Carrillo et al., 2014; Kerry et al., 2011), relacionado con BSL y VOI. BNA en NP G356R (Ye et al., 2006) y NS1, G45 relacionado con VOI (Cheng, Wong, & Yuan, 2009). Todos estos sitios han sido descritos por análisis cristalográfico o computacional (tabla 2).

En HA se observaron cambios que podrían afectar la inmunogenicidad del virus de la influenza; las secuencias de 2015 a 2016 tuvieron mutaciones adicionales (S162N) en el sitio antigénico (Sa) y junto con la sustitución I276T definen en un nuevo clado 6B.1 (Elderfield et al., 2014; Garten et al., 2012). Es importante destacar que S162N puede conferir un sitio de glicosilación adicional en HA que podría afectar aún más la inmunogenicidad del virus de influenza en el futuro.

Debido a la evolución de los virus de influenza AH1N1pdm09, desarrollar vacunas efectivas que correspondan a las secuencias de los virus circulantes dependerá de la robustez de los datos disponibles sobre la biología molecular y evolución viral; se deben incluir estudios filogenéticos a gran escala además de los análisis antigénicos para poder realizar las recomendaciones internacionales sobre las cepas vacunales requeridas para cada estación. En éste estudio encontramos sustituciones que modificaron las topologías filogenéticas, pero para 2014 no hubo necesidad de usar otra cepa de referencia para la vacunación debido a la baja actividad viral que se reportó de AH1N1pdm09 en 2012-2013 (WHO, 2012; World Health Organization, 2014)

Nuestros resultados indican que el virus de influenza pandémica cambia a través de las temporadas y muestran cómo el uso de secuencias de genoma completo es capaz de proporcionar una comprensión más profunda de la evolución del virus.

Conclusiones

Una de las principales restricciones en la preparación para enfrentar una pandemia es el conocimiento limitado que ofrecen los abordajes parciales de la genética de los virus de influenza, por lo que consideramos de mayor utilidad un abordaje genómico completo.

Hasta éste punto aún no se puede predecir con certeza cuál virus de influenza se convertirá en peligroso o cuándo el virus de influenza AH1N1pdm09 podrá adquirir nuevas ventajas que pudieran resultar perjudiciales para la salud humana. El único camino para reducir la incertidumbre es entender biológica y epidemiológicamente cómo cambian los virus, a nivel genómico, a través del tiempo y cómo se distribuyen globalmente.

Particularmente en este trabajo encontramos nuevas tendencias de variación, en tiempos definidos, que podrían dar un indicio de seguimiento y de la interacción que podría haber entre los segmentos virales y su evolución particular, ya que encontramos cambios entre los virus de los años 2014 y 2016 que proporcionaron topologías particulares en los árboles filogenéticos.

Por otra parte, encontrar mutaciones cercanas a sitios antigénicos en HA ha sido parte fundamental en éste trabajo ya que nuestros datos indican que se puede ver afectado el grado de inmunogenicidad del virus de influenza, lo cual forma parte de la vigilancia epidemiológica, útil para el seguimiento y vigencia de las dosis vacunales, que se distribuyan alrededor del mundo, efectivas ante nuevos brotes virales de influenza AH1N1pdm09.

ANEXO I

Tabla A1. Números de acceso de secuencias utilizadas como referencia y números de acceso de las secuencias obtenidas en éste estudio

Gene	Números de Acceso A/California/07/2009(H1N1)/2009	Números de Acceso secuencias 2012	Números de Acceso secuencias 2013-2014
PB2	KC781783	KR820943	KR271532
		KR821005	KR271548
		KR820959	KR271604
		KR821037	KR271540
		KR821013	KR271556
		KR821001	KR271564
		KR820977	KR271572
		KR821021	KR271580
		KR821045	KR271588
		KR820985	KR271596
		KR820935	
		KR820993	
		KR820951	
		KR821029	
		KR820928	
KR820967			
PB1	KC781787	KR820944	KR271533

FJ969531	KR821006	KR271549
	KR821014	KR271605
	KR820978	KR271541
	KR821022	KR271557
	KR821046	KR271565
	KR820986	KR271573
	KR820936	KR271581
	KR820952	KR271589
	KR821030	KR271597
	KR820929	
	KR820968	
PA KC781786	KR820945	KR271534
	KR821007	KR271550
	KR821039	KR271606
	KR820979	KR271542
	KR821023	KR271558
	KR821047	KR271566
	KR820987	KR271574
	KR820937	KR271582
	KR820953	KR271590
	KR821031	KR271598
	KR820969	

HA	KF009554	KR820946	KR271535
	FJ981613	KR821008	KR271551
		KR820962	KR271607
		KR821040	KR271543
		KR821016	KR271559
		KR820980	KR271567
		KR821024	KR271575
		KR821048	KR271583
		KR820988	KR271591
		KR820938	KR271599
		KR820996	
		KR820954	
		KR821032	
NP	FJ969536	KR820974	KR271536
	GQ338390	KR820947	KR271552
		KR821009	KR271608
		KR820963	KR271544
		KR821041	KR271560
		KR821002	KR271568
		KR820981	KR271576
		KR821025	KR271584
		KR821049	KR271592

		KR820989	KR271600
		KR820939	
		KR821033	
		KR820931	
		KR820970	
NA	KF009555	KR820948	KR271537
	GQ377078	KR821010	KR271553
		KR821042	KR271609
		KR820982	KR271545
		KR821026	KR271561
		KR821050	KR271569
		KR820990	KR271577
		KR820940	KR271585
		KR820956	KR271593
		KR821034	KR271601
		KR820932	
		KR820971	
M	FJ966975	KR820975	KR271538
	FJ969527	KR820949	KR271554
		KR821011	KR271610
		KR820965	KR271546
		KR821043	KR271562

		KR821019	KR271570
		KR821003	KR271578
		KR820983	KR271586
		KR821027	KR271594
		KR821051	KR271602
		KR820991	
		KR820941	
		KR820999	
		KR820957	
		KR821035	
		KR820933	
		KR820972	
NS	KC781782	KR820976	KR271539
		KR820950	KR271555
		KR821012	KR271611
		KR820966	KR271547
		KR821044	KR271563
		KR821020	KR271571
		KR821004	KR271579
		KR820984	KR271587
		KR821028	KR271595
		KR821052	KR271603

KR820992

KR820942

KR821000

KR820958

KR821036

KR820934

KR820973

Referencias

- Arellano-Llamas, R., Alfaro-Ruiz, L., Canon, C. A., Rosshandler, I. I., Cruz-Lagunas, A., Zúñiga, J., ... Vázquez-Pérez, J. A. (2017). Molecular features of influenza A (H1N1) pdm09 prevalent in Mexico during winter seasons 2012-2014. *PLoS ONE*, *12*(7), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0180419>
- Babakir-Mina, M., Dimonte, S., Perno, C. F., & Ciotti, M. (2009). Origin of the 2009 Mexico influenza virus: A comparative phylogenetic analysis of the principal external antigens and matrix protein. *Archives of Virology*, *154*(8), 1349–1352. <http://doi.org/10.1007/s00705-009-0438-1>
- Bell, D., Nicoll, A., Fukuda, K., Horby, P., Monto, A., Hayden, F., ... Van Tam, J. (2006). Nonpharmaceutical interventions for pandemic influenza, international measures. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(1), 81–87. <http://doi.org/10.3201/eid1201.051370>
- Belz, G. T., Xie, W., & Doherty, P. C. (2001). Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza a virus-specific CD8+ T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *166*(7), 4627–4633. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4627>
- Bush, R., Bender, C., Subbarao, K., Cox, N., & Fitch, W. (1999). Predicting the evolution of human influenza A. *Science*, *286*(5446), 183–185. <http://doi.org/10.1126/science.286.5446.1921>
- Carrillo, B., Choi, J.-M., Bornholdt, Z. A., Sankaran, B., Rice, A. P., & Prasad, B. V. V. (2014). The influenza A virus protein NS1 displays structural polymorphism. *Journal of virology*, *88*(8), 4113–22. <http://doi.org/10.1128/JVI.03692-13>
- Cheng, A., Wong, S. M., & Yuan, Y. A. (2009). Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell research*, *19*, 187–195. <http://doi.org/10.1038/cr.2008.288>
- Colman, P. M., Hoyne, P. A., & Lawrence, A. M. C. (1993). Sequence and Structure Alignment of Paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase with Influenza Virus Neuraminidase. *Journal of Virology*, *67*(6), 2972–2980.
- Cox, N., & Subbarao, K. (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. *Annual reviews of medicine*, *51*, 407–421. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.51.1.407>
- Das, K., Ma, L.-C., Xiao, R., Radvansky, B., Aramini, J., Zhao, L., ... Montelione, G. T. (2008). Structural basis for suppression of a host antiviral response by

- influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 13093–8.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0805213105>
- DJ, A. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 74, 3–13.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, 5, 113.
<http://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Elderfield, R. a., Watson, S. J., Godlee, a., Adamson, W. E., Thompson, C. I., Dunning, J., ... Barclay, W. S. (2014). Accumulation of Human-Adapting Mutations during Circulation of A(H1N1)pdm09 Influenza Virus in Humans in the United Kingdom. *Journal of Virology*, 88(22), 13269–13283.
<http://doi.org/10.1128/JVI.01636-14>
- Escalera-Zamudio, M., Cobián-Güemes, G., de los Dolores Soto-del Río, M., Isa, P., Sánchez-Betancourt, I., Parissi-Crivelli, A., ... Arias, C. F. (2012). Characterization of an influenza A virus in Mexican swine that is related to the A/H1N1/2009 pandemic clade. *Virology*, 433(1), 176–182.
<http://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.003>
- Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. (2005). Virus taxonomy. En *Virus taxonomy* (8a ed., pp. 682–689). Oxford, UK: Elsevier.
- Felsenstein, J. (1981). J Mol Evol (1981) 17368-376Molecular Evolution □ 2009 Felsenstein.pdf, 368–376. <http://doi.org/10.1007/BF01734359>
- FigTree. (s/f). Recuperado el 23 de marzo de 2015, a partir de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Fineberg, H. V. (2014). Pandemic Preparedness and Response — Lessons from the H1N1 Influenza of 2009. *New England Journal of Medicine*, 370(14), 1335–1342. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1208802>
- Fouchier, R. A. M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., ... Rimmelzwaan, G. F. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*, 79(5), 2814–2822.
<http://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2814>
- Gamblin, S. J., Haire, L. F., Russell, R. J., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., ... Skehel, J. J. (2004). The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin. *Science*, 303(5665), 1838–1842.

<http://doi.org/10.1126/science.1093155>

- Garten, R., Davis, C., Russell, C., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., ... Cox, N. J. (2012). NIH Public Access, 325(5937), 197–201.
<http://doi.org/10.1126/science.1176225>. Antigenic
- Graur, D., & Li, W.-H. (2000). *Fundamentals of molecular evolution* (second). USA: Sinauer Associates, Inc.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <http://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Gulati, U., Hwang, C.-C., Venkatramani, L., Gulati, S., Stray, S. J., Lee, J. T., ... Air, G. M. (2002). Antibody Epitopes on the Neuraminidase of a Recent H3N2 Influenza Virus (A/Memphis/31/98). *Journal of Virology*, 76(23), 12274–12280. <http://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12274-12280.2002>
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. aki. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160–174. <http://doi.org/10.1007/BF02101694>
- Hayashi, T., Wills, S., Bussey, K. A., & Takimoto, T. (2015). Identification of Influenza A Virus PB2 Residues Involved in Enhanced Polymerase Activity and Virus Growth in Mammalian Cells at Low Temperatures. *Journal of virology*, 89(15), 8042–8049. <http://doi.org/10.1128/JVI.00901-15>
- Hilleman, M. R. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: Pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*, 20(25-26), 3068–3087. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00254-2](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00254-2)
- Holmes, E. C., Ghedin, E., Miller, N., Taylor, J., Bao, Y., St. George, K., ... Taubenberger, J. K. (2005). Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biology*, 3(9), 1579–1589. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030300>
- Horimoto, T., Wells, K., Ishida, H., Kiso, M., Suzuki, Y., Takada, A., ... Suzuki, T. (2002). Recognition of N-Glycolylneuraminic Acid Linked to Galactose by the alpha 2,3 Linkage Is Associated with Intestinal Replication of Influenza A Virus in Ducks. *Journal of Virology*, 74(19), 9300–9305. <http://doi.org/10.1128/jvi.74.19.9300-9305.2000>
- Kerry, P. S., Ayllon, J., Taylor, M. A., Hass, C., Lewis, A., García-Sastre, A., ...

- Russell, R. J. (2011). A transient homotypic interaction model for the Influenza A virus NS1 protein effector domain. *PLoS ONE*, 6(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017946>
- Kowalinski, E., Zubieta, C., Wolkerstorfer, A., Szolar, O. H. J., Ruigrok, R. W. H., & Cusack, S. (2012). Structural Analysis of Specific Metal Chelating Inhibitor Binding to the Endonuclease Domain of Influenza pH1N1 (2009) Polymerase. *PLoS Pathogens*, 8(8). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002831>
- Lapinsky, S. (2010). Epidemic viral pneumonia. *Current Opinion Infectious Disease*, 139–144.
- Li, J., Ishaq, M., Prudence, M., Xi, X., Hu, T., Liu, Q., & Guo, D. (2009). Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2. *Virus Research*, 144(1-2), 123–129. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.04.008>
- Lin, Y. P., Gregory, V., Bennett, M., & Hay, A. (2004). Recent changes among human influenza viruses. *Virus Research*, 103(1-2), 47–52. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.02.011>
- Lindstrom, S. E., Hiromoto, Y., Nerome, R., Omoe, K., Sugita, S., Yamazaki, Y., ... Nerome, K. (1998). Phylogenetic analysis of the entire genome of influenza A (H3N2) viruses from Japan: evidence for genetic reassortment of the six internal genes. *Journal of virology*, 72(10), 8021–8031.
- Ma, W., Lager, K. M., Vincent, A. L., Janke, B. H., Gramer, M. R., & Richt, J. A. (2009). The role of swine in the generation of novel influenza viruses. *Zoonoses and Public Health*, 56(6-7), 326–337. <http://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01217.x>
- Mahan, M. J., Kubicek-Sutherland, J. Z., & Heithoff, D. M. (2013). Rise of the microbes. *Virulence*, 4(3), 213–222. <http://doi.org/10.4161/viru.23380>
- Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Einfeld, A. J., Neumann, G., Hase, T., ... Kawaoka, Y. (2013). A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Systems Biology*, 7. <http://doi.org/10.1186/1752-0509-7-97>
- Meijers, R., Lai, C. C., Yang, Y., Liu, J. H., Zhong, W., Wang, J. H., & Reinherz, E. L. (2005). Crystal structures of murine MHC class I H-2 D b and K b molecules in complex with CTL epitopes from influenza A virus: Implications for TCR repertoire selection and immunodominance. *Journal of Molecular Biology*, 345(5), 1099–1110. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.023>

- Miotto, O., Heiny, A., Tan, T. W., August, J. T., & Brusica, V. (2008). Identification of human-to-human transmissibility factors in PB2 proteins of influenza A by large-scale mutual information analysis. *BMC Bioinformatics*, *9 Suppl 1*, S18. <http://doi.org/1471-2105-9-S1-S18> [pii]r10.1186/1471-2105-9-S1-S18
- Mishel, P., Ojala, T., Benner, C., Lakspere, T., Bychkov, D., Jalovaara, P., ... Kainov, D. E. (2015). Comparative Analysis of Whole-Genome Sequences of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Isolated from Hospitalized and Nonhospitalized Patients Identifies Missense Mutations That Might Be Associated with Patient Hospital Admissions in Finland during 2009 to 2014. *Genome Announcements*, *3(4)*, e00676–15+. <http://doi.org/10.1128/genomea.00676-15>
- Mitnaul, L., Ito, T., Vines, A., Suzuki, Y., Kawaoka, Y., & Kida, H. (2002). Receptor Specificity of Influenza A Viruses Correlates with the Agglutination of Erythrocytes from Different Animal Species. *Virology*, *227(2)*, 493–499. <http://doi.org/10.1006/viro.1996.8323>
- Molinari, N. A. M., Ortega-Sanchez, I. R., Messonnier, M. L., Thompson, W. W., Wortley, P. M., Weintraub, E., & Bridges, C. B. (2007). The annual impact of seasonal influenza in the US: Measuring disease burden and costs. *Vaccine*, *25(27)*, 5086–5096. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.046>
- Mukherjee, A., Nayak, M. K., Dutta, S., Panda, S., Satpathi, R., & Chawla-sarkar, M. (2016). Genetic Characterization of Circulating 2015 A (H1N1) pdm09 Influenza Viruses from Eastern India, 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0168464>
- Nelson, M. I., & Holmes, E. C. (2007). The evolution of epidemic influenza. *Nature Reviews Genetics*, *8(3)*, 196–205. <http://doi.org/10.1038/nrg2053>
- Nelson, M. I., & Vincent, A. L. (2015). Reverse zoonosis of influenza to swine: New perspectives on the human-animal interface. *Trends in Microbiology*, *23(3)*, 142–153. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.002>
- Nelson, M., Spiro, D., Wentworth, D., Fan, J., Beck, E., George, K. S., ... The, H. K. (2009). The early diversification of influenza A / H1N1pdm, 1–6. <http://doi.org/10.1371/currents.RRN1126.Abstract>
- Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, *459(7249)*, 931–939. <http://doi.org/10.1038/nature08157>
- Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. (2009).

- Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *New England Journal of Medicine*, 360(25), 2605–26015.
<http://doi.org/10.1056/NEJMoa0903810>
- Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., ... Park, S. Y. (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature*, 454(7208), 1127–1131.
<http://doi.org/10.1038/nature07225>
- Ohtsu, Y., Honda, Y., Sakata, Y., Kato, H., & Toyoda, T. (2002). Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiology and immunology*, 46(3), 167–75. <http://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02682.x>
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 312(5772), 384–388. <http://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Olsen, C. W. (2002). The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Research*, 85(2), 199–210. [http://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00027-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00027-8)
- Pauly, M. D., Procario, M. C., & Luring, A. S. (2017). A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *eLife*, 6, 1–18. <http://doi.org/10.7554/eLife.26437>
- Perez-Padilla, R., de la Rosa-Zamboni, D., Ponce de Leon, S., Hernandez, M., Quiñones-Falconi, F., Bautista, E., ... Cordova-Villalobos, J. A. (2009). Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *The New England journal of medicine*, 361(7), 680–689.
<http://doi.org/10.1056/NEJMoa0904252>
- Petrova, V. N., & Russell, C. A. (2018). The evolution of seasonal influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 47–60.
<http://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>
- Rogers, G. N., & Paulson, J. C. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 127(2), 361–373.
[http://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90150-2](http://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90150-2)
- S.M.E.C. (2004). Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5664), 1666–1669. <http://doi.org/10.1126/science.1092002>

- Schnell, J. R., & Chou, J. J. (2008). Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, *451*(7178), 591–5.
<http://doi.org/10.1038/nature06531>
- Scholtissek, C., Bürger, H., Kistner, O., & Shortridge, K. F. (1985). The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*, *147*(2), 287–294.
[http://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90131-X](http://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90131-X)
- Seyer, R., Hrinčius, E. R., Ritzel, D., Abt, M., Mellmann, A., Marjuki, H., ... Ehrhardt, C. (2012). Synergistic adaptive mutations in the hemagglutinin and polymerase acidic protein lead to increased virulence of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus in mice. *Journal of Infectious Diseases*, *205*(2), 262–271.
<http://doi.org/10.1093/infdis/jir716>
- Shinde, V., Bridges, C., Uyeki, T., Shu, B., Balish, A., Xu, X., ... Finelli, L. (2009). Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005–2009, 1–10.
- Shinya, Y., Hatta, M., Staker, B. L., Watanabe, S., Imai, M., Shinya, K., ... Kawaoka, Y. (2010). Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathogens*, *6*(8), 15–16.
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001034>
- Shu, B., Wu, K.-H., Emery, S., Villanueva, J., Johnson, R., Guthrie, E., ... Lindstrom, S. (2011). Design and performance of the CDC real-time reverse transcriptase PCR swine flu panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. *Journal of clinical microbiology*, *49*(7), 2614–2619.
<http://doi.org/10.1128/JCM.02636-10>
- Smith, G. J. D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., ... Rambaut, A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, *459*(7250), 1122–1125.
<http://doi.org/10.1038/nature08182>
- Song, H.-D., Tu, C.-C., Zhang, G.-W., Wang, S.-Y., Zheng, K., Lei, L.-C., ... Zhao, G.-P. (2005). Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(7), 2430–2435.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0409608102>
- Strauss, James Strauss, E. (2008). Viruses and human disease. En *viruses and human disease* (2a ed., pp. 137–175). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
 Recuperado a partir de <https://books.google.com.mx/books?hl=en&lr=&id=->

y5BZk7LQ_4C&oi=fnd&pg=PP2&dq=strauss+J,+strauss+E.+Minus-strand+RNA+viruses+in+Viruses+and+human+disease&ots=d11pAvKlpn&sig=Gypi9dvL8J0Ty6z5Ezb7zf6urxA#v=onepage&q=strauss J, strauss E. Minus-strand RNA viru

- Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, D., ... Suzuki, Y. (1997). Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Letters*, *404*(2-3), 192–196. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00127-0](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00127-0)
- Suzuki, Y. (2005). Sialobiology of Influenza: Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses. *Biological & Pharmaceutical Bulletin**Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *28*(3), 399–408. <http://doi.org/10.1248/bpb.28.399>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Te Velthuis, A. J. W., & Fodor, E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: Insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(8), 479–493. <http://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>
- Tong, S. (2019). New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses, 1–14.
- Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., & Gramer, M. (2012). Transmission of Influenza A Virus in Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, *59*(SUPPL. 1), 68–84. <http://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x>
- Tuzikov, A., Matrosovich, M., Klimov, A., Castrucci, M. R., Gambaryan, A., Bovin, N., ... Kawaoka, Y. (2002). Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals. *Journal of Virology*, *74*(18), 8502–8512. <http://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000>
- Van Den Dool, C., Hak, E., Bonten, M. J. M., & Wallinga, J. (2009). A model-based assessment of oseltamivir prophylaxis strategies to prevent influenza in nursing homes. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(10), 1547–1555. <http://doi.org/10.3201/eid1510.081129>
- Wagner, E. K., Hewlett, M. J., Bloom, D. C., & Camerini, D. (2009). Basic virology (3a ed., pp. 283–288). Malden Massachusetts: Blackwell Publishing.

- Wang, W., Suguitan, A. L., Zengel, J., Chen, Z., & Jin, H. (2012). Generation of recombinant pandemic H1N1 influenza virus with the HA cleavable by bromelain and identification of the residues influencing HA bromelain cleavage. *Vaccine*, *30*(5), 872–878. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.101>
- Webby, R. J., & Webster, R. G. (2001). Emergence of influenza A viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *356*(1416), 1817–1828. <http://doi.org/10.1098/rstb.2001.0997>
- Webster, R., Bean, W., Gorman, O., Chambers, T., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews*, *56*(1), 152–179. Recuperado a partir de <http://mmb.asm.org/content/56/1/152.short>
- WHO. (s/f). Pndemic H1N1 2009 update. Recuperado a partir de http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/
- WHO. (2012). FluNet charts. Recuperado el 13 de marzo de 2012, a partir de http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en/index.html
- World Health Organization. (2014). *Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-2014 northern hemisphere influenza season*.
- Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1)2009 Influenza. (2010). Clinical Aspects of Pandemic 2009 Influenza. *The New England journal of medicine*, *18*(362), 1708–1719.
- Yang, H., Chang, J. C., Guo, Z., Carney, P. J., Shore, D. a, Donis, R. O., ... Stevens, J. (2014). Structural stability of influenza A(H1N1)pdm09 virus hemagglutinins. *Journal of virology*, *88*(9), 4828–38. <http://doi.org/10.1128/JVI.02278-13>
- Ye, Q., Krug, R. M., & Tao, Y. J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, *444*(7122), 1078–1082. <http://doi.org/10.1038/nature05379>
- Yin, C., Khan, J. A., Swapna, G. V. T., Ertekin, A., Krug, R. M., Tong, L., & Montelione, G. T. (2007). Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(28), 20584–20592. <http://doi.org/10.1074/jbc.M611619200>
- Yoo, E. S. (2011). Study of specific oligosaccharide structures related with swine flu (H1N1) and avian flu, and tamiflu as their remedy. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(5), 449–454. <http://doi.org/10.4014/jmb.1009.09013>

- Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., ... Liu, Y. (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature*, *458*(7240), 909–913. <http://doi.org/10.1038/nature07720>
- Zhang, C.-Y., Wei, J.-F., & He, S.-H. (2006). Adaptive evolution of the spike gene of SARS coronavirus: changes in positively selected sites in different epidemic groups. *BMC microbiology*, *6*, 88. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-6-88>
- Zhang, N., Qi, J., Feng, S., Gao, F., Liu, J., Pan, X., ... Gao, G. F. (2011). Crystal Structure of Swine Major Histocompatibility Complex Class I SLA-1*0401 and Identification of 2009 Pandemic Swine-Origin Influenza A H1N1 Virus Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Peptides. *Journal of Virology*, *85*(22), 11709–11724. <http://doi.org/10.1128/JVI.05040-11>
- Zhao, C., Lou, Z., Guo, Y., Ma, M., Chen, Y., Liang, S., ... Rao, Z. (2009). Nucleoside monophosphate complex structures of the endonuclease domain from the influenza virus polymerase PA subunit reveal the substrate binding site inside the catalytic center. *Journal of Virology*, *83*(18), 9024–9030. <http://doi.org/10.1128/JVI.00911-09>
- Zhou, B., Donnelly, M. E., Scholes, D. T., George, K. S., Hatta, M., Kawaoka, Y., ... David, E. (2009). Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin. *Society*, *83*(19), 10309–10313. <http://doi.org/10.1128/JVI.01109-09>