

**Caracterización molecular de virus de Influenza  
Aviar aislados en México**

**T E S I S**

**Para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la  
Producción y Salud Animal**

**P r e s e n t a :  
Jessica Alejandra Molina Hernández**

Tutor: Dr. Rogelio A. Alonso Morales

Comité Tutoral: Dr. Luis Padilla Noriega  
Dr. Álvaro Aguilar Setien

México, D. F.,

2008



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.

## DEDICATORIA

A Dios, gracias por todo.

A mi querido hijo Alejandro que ha sido la inspiración de todos mis proyectos.

A mis padres Ruth y Juan Luis por todo su amor y apoyo.

A mi hermano Luis por su apoyo.

Tita, Angi y Nacho gracias por su amor y consejos.

A Ricardo por su amor incondicional y todo su apoyo.

A mis grandes amigos de generación, Sinaí, Adrian, Cinthia, Efrén y Claudia, por su amistad incondicional.

A mis queridos amigos de posgrado, Margarita, Julieta, María Elena, Sonia y Alejandro, por su gran apoyo.

A mis inolvidables amigos del laboratorio de genética molecular, Amanda, Clavo, Rafufis, Fer, Alex, Héctor, Marianita y Paulina, por su amistad y apoyo incondicional.

A mis profesores, Dr. Tamas Fehervari y Dra. Ma. Teresa Casaubón que han sido pilares en mi formación profesional, les debo mucho.

Al Dr. Rogelio Alonso por la gran oportunidad de realizar este trabajo.

A todas aquellas personas que con sus buenas o malas intenciones me motivan a seguir adelante...

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Departamento de Genética y Bioestadística.

A todo el personal del laboratorio de Genética Molecular.

Al Departamento de Producción Animal: Aves

A mis queridos profesores Dr. Tamas Fehervari y Dra. Ma. Teresa Casaubón por su paciencia, sabiduría y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Rogelio Alonso por confiar en mi y brindarme su apoyo.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Nestor Ledesma Martínez, Dr. Luis Padilla Noriega, Dr. Gary García Espinosa y Dr. Alvaro Aguilar Setien por sus valiosas aportaciones y sugerencias.

Al Dr. José Carmen Gudiño del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica por su valiosa colaboración.

Al Dr. Pedro Paz y Dra. Carmen Castro de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales.

Al Dr. Assad Heneidi de la Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural y Pesca.

A la Biol. Amanda Gayosso del laboratorio de Genética Molecular.

A la SAGARPA por el financiamiento para la realización de este trabajo.

## INDICE

<b>DEDICATORIAS</b> -----	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> -----	<b>II</b>
<b>INDICE</b> -----	<b>III</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> -----	<b>IV</b>
<b>INDICE DE CUADROS Y MAPA</b> -----	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS</b> -----	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b> -----	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>VIII</b>
I.INTRODUCCIÓN-----	1
I.1.ANTECEDENTES-----	2
I.2.DISTRIBUCIÓN Y SALUD PÚBLICA-----	3
I.3.IMPORTANCIA ECONÓMICA -----	5
I.4.INFLUENZA AVIAR EN MÉXICO-----	5
I.5.CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA-----	6
I.6.CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS DE INFLUENZA AVIAR-----	7
I.6.1.Glicoproteína HA-----	8
I.6.2.Mutaciones-----	9
I.6.3.Replicación del virus-----	10
I.7.TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA-----	10
I.8. SECUENCIACIÓN-----	11
I.9.ANÁLISIS FILOGENÉTICOS-----	12
II.JUSTIFICACIÓN-----	12
III.HIPÓTESIS-----	14
IV.OBJETIVO GENERAL-----	14
V.OBJETIVOS PARTICULARES-----	15
VI.METAS-----	15
VII.MATERIAL Y MÉTODOS-----	15
VII.1.Obtención de los virus-----	15
VII.2.Extracción de ARN viral-----	17
VII.3.Síntesis de ADNc del gen HA-----	18
VII.4.Amplificación del gen HA del virus de Influenza Aviar-----	18
VII.5.Evaluación de amplificación de los segmentos del gen HA-----	20
VII.6.Purificación de productos de PCR para secuenciación-----	20
VII.7 Secuenciación-----	20
VII.8.Purificación de la reacción de secuenciación.-----	21
VII.9.Lectura de secuencias, edición y elaboración de árboles filogenéticos-----	21
VIII.RESULTADOS-----	22
VIII.1. Amplificación del gen HA por PCR-----	22
VIII.2. Secuencias de nucleótidos del gen HA de 36 aislados-----	24
VIII.3. Comparación de secuencias-----	25
VIII.4. Relaciones genéticas entre los aislados mexicanos-----	25
VIII.5. Relaciones genéticas entre los aislados mexicanos actuales y previamente descritos-----	33
IX. DISCUSIÓN-----	35
X. CONCLUSIONES-----	38
XI. LITERATURA CITADA-----	39
XII. ANEXOS-----	43

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Se muestran los 3 fragmentos que se amplifican con los diferentes pares de oligonucleótidos del gen HA.	19
Figura 2. Resultado de la electroforesis en un gel de agarosa al 1% en donde se muestran los productos de amplificación obtenidos a partir del ADNc del gen HA del virus IA con los iniciadores HAF+HAR, IANestF+IANestR, HAF+IANestR. Se aprecia con una flecha la banda de amplificación del gen HA con los diferentes juegos de oligonucleótidos. Además de la banda amplificada del gen HA, se aprecian bandas inespecíficas.	23
Figura 3. Productos de amplificación empleando oligonucleótidos a) IANestF+IAR2 ( <b>G1</b> ), b) IAF1+IAR1 ( <b>G2</b> ) y IANestR+IAF2 ( <b>P</b> ), las condiciones de reasociación de G1 fue de 48°C, G2 y P a 52°C. A éstas temperaturas los oligos de estos 3 fragmentos generaron bandas únicas y abundantes.	24
Figura 4. Secuencia consenso del aislado 27 generada a partir de secuencias parciales.	25
Figura 5. Dendrograma donde se muestran las relaciones genéticas presentes entre 35 cepas del virus de influenza aviar mexicanos aislados en los años 2005 y 2006, y una cepa de referencia (gen HA.txt = Hidalgo/28159-232/1994 CY006040).	27
Figura 6. Dendrograma donde se muestran las relaciones genéticas presentes entre 35 cepas de virus de influenza aviar mexicanos en los años 2005 y 2006, con referencia a aislados previamente descritos desde el año 1994.	34

## INDICE DE CUADROS Y MAPA

CUADRO 1. Procedencia de los 36 aislados del virus de influenza aviar.	16
CUADRO 2. Oligonucleótidos utilizados en el estudio para reacciones de RT-PCR y secuenciación.	19
CUADRO 3. Similitud genética entre las secuencias completas de nucleótidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación a un aislado de referencia (Hidalgo/28159-232/1994 CY006040).	28
CUADRO 4. Similitud genética entre las secuencias completas de aminoácidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación a un aislado de referencia (Hidalgo/28159-232/1994 CY006040).	29
CUADRO 5. Similitud genética entre las secuencias completas de aminoácidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación a la cepa 15.	30
CUADRO 6. Similitud genética entre las secuencias completas de nucleótidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación al aislado 15.	31
MAPA. Origen de los diferentes aislados y las diferentes líneas de diferenciación genética de Influenza Aviar 2005-2006	32

## Abreviaturas

ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ADNc	Acido desoxiribonucleico complementario
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
IA	Influenza aviar
IABP	Influenza aviar de baja patogenicidad
IAAP	Influenza aviar de alta patogenicidad
RT	Transcripción reversa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
HA	Hemaglutinina
NA	Neuroaminidasa
BP	Baja patogenicidad
AP	Alta patogenicidad

## **Resumen**

La influenza aviar (IA) es una de las enfermedades más importantes dentro de la avicultura mundial ya que tiene una gran importancia económica y en salud pública. En México en 1993 hubo un brote de IA causado por un H5N2 de baja patogenicidad (BP), en 1994-1995 emergió un virus de IA de alta patogenicidad (AP), éste último fue erradicado mediante el uso de vacunación, pero desde entonces el virus de BP se ha mantenido en todo el país. Aunque se erradicó el virus de IA AP, la presencia del virus de BP lleva el riesgo que muté nuevamente a un virus de AP. Estudios recientes muestran que desde el tiempo que se introdujo la vacuna empleada contra IA, que no ha cambiado desde su introducción; los virus de IA han estado variando, presentando cambios antigénicos y la vacuna aunque previene signos clínicos y muerte, no previene la excreción de los virus por aves infectadas, lo que promueve que el virus continúe replicándose y acumulando mutaciones. El objetivo de este trabajo fue secuenciar el gen de la hemaglutinina HA (1695pb) en 36 virus de IA aislados en 2005-2006 en México. Se determinó el grado de diferenciación genética y distancias genéticas entre las cepas estudiadas y en comparación a aislados de 1994-2001. En relación a una a una cepa aislada en 1994, el grado de similitud de nucleótidos varió entre un 91 y 92%, y a nivel de aminoácidos osciló entre el 88 y 90%. Al comparar entre si los aislados del 2005 y 2006, difieren a nivel de nucleótidos entre el 2 y 7%, con 1-7% de aminoácidos diferentes. El análisis genético realizado a partir de la secuencia completa del gen HA muestra claramente que las cepas de IA que se están propagando actualmente en el país han sufrido múltiples cambios evolutivos. El análisis filogenético muestra entre los virus de IA contemporáneos 5 líneas de diferenciación genética, aunque algunas de las líneas de diferenciación tienen semejanzas entre sí, encontrando tres linajes evolutivos principales. Se desconoce como la diversidad genética de las cepas virales de IA esta afectando sus características y sus relaciones antigénicas.

Palabras clave: Influenza aviar, diversidad genética, México

## **ABSTRACT**

Avian influenza (AI) is one of the most important diseases in the poultry industry, because of its relevance to public health and economical losses. In 1993, México had an outbreak of AI caused by a low pathogenic avian influenza virus (LPAI) H5N2, in 1994-1995 emerged a virus highly pathogenic AI (HPAI), this one was eradicated by vaccination, however, the LP virus AI has remained in the country. Although the HP virus was eradicated, the presence of LP virus has the risk of the development of a HP form. Recently studies has shown that since the introduction of the vaccine against AI, the virus has been changing, showing antigenic drift; even though the vaccine prevent clinical signs and dead, it doesn't prevent virus shedding by infected birds, allowing replication of virus and mutations. The aim of this study was the sequencing of the hemmaglutinin HA gene (1965pb) in 36 Mexican isolates at 2005 and 2006. It was established the phylogenetic relationships among the studied isolates, and with IA viruses previously described in 1994-2001.

In comparison to an isolate of 1994, the percentages of nucleotide and amino acid similarities ranged from 91 to 92% and 88 to 90%, respectively. Among the 2005 and 2006 HA sequences, the percentages of nucleotide and amino acid similarities, ranged from 2 to 7% and 1 to 7%, respectively. The genetic analysis shows that the currents strains of AI in México are having many evolutive changes. The phylogenetic analysis shows that the contemporary AI viral strains has five lineages of genetic differentiation, although some lineages are more close related, distinguishing three main nodes. Its is not known how the genetic diversity of the current IA viral strains is affecting their antigenic characteristics and the antigenic relationship among them.

**Key words** Avian influenza, genetic diversity, México

## **I. INTRODUCCIÓN**

La influenza aviar (IA) es una de las enfermedades más importantes de la industria avícola que impacta negativamente la salud y el comercio internacional de las aves y sus productos.<sup>1</sup>

El virus de la IA continuamente transita de reservorios en aves silvestres a las parvadas comerciales produciendo enfermedades que van desde asintomáticas, hasta severas. Cepas con nuevas propiedades antigénicas y patológicas pueden aparecer por deriva mutacional ó por segregación genómica al recombinar con virus de influenza de otras especies (humanos y cerdos). Las cepas virales de IA comúnmente son de baja patogenicidad (BP), asociadas a enfermedad respiratoria, reducción en la producción de huevo y baja mortalidad. Ocasionalmente, llegan a aparecer cepas altamente patógenas (AP). Estas son consideradas por la Oficina Internacional de Epizootias en la "Lista A" debido a que causan enfermedad sistémica con alta mortalidad.<sup>1</sup>

En la mayoría de los países desarrollados la IA no es endémica. En México en 1993 un brote de IA fue causado por un virus de serotipo H5N2 BP, en 1994-1995 emergieron varias cepas AP. Desde 1996 no se han reportado cepas AP, pero cepas virales de BP se han mantenido endémicas. El control de la IA en varios países comúnmente se efectúa por medio de cerco sanitario y eliminación masiva de las parvadas expuestas. En México el control de IA se ha logrado por medio de la vacunación masiva. Desde 1995 se autorizó el uso de una vacuna inactiva emulsificada, a partir de 1998 se aprobó el uso de una vacuna recombinante que emplea como vector un poxvirus aviar. El uso de estas vacunas ha continuado hasta nuestros días, sin embargo el virus ha seguido propagándose y se desconoce que tanto ha cambiado genética y antigénicamente. Este conocimiento es fundamental para poder elegir los determinantes antigénicos apropiados que conformen a una nueva vacuna que mejore los niveles de contención del virus de influenza aviar en México.<sup>2</sup>

## **I.1 ANTECEDENTES**

La influenza aviar (IA) es una enfermedad viral altamente contagiosa de transmisión horizontal que se caracteriza por producir problemas respiratorios en aves. Es considerada una de las enfermedades aviares más importante debido a sus implicaciones económicas y en salud pública.<sup>1</sup>

La historia de la influenza aviar (IA) puede ser dividida en cuatro periodos: a) reconocimiento de influenza en aves con respecto a otras enfermedades, como cólera aviar y la enfermedad de Newcastle, b) primeros reportes de brotes de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP), c) reconocimiento de la existencia de dos formas clínicas, la menos severa o baja y de la alta patogenicidad, y d) identificación del virus de IA en aves silvestres como reservorio de la enfermedad.<sup>1</sup>

El primer reporte de brote, causada por el virus IA, fue identificado por Perroncito en Italia en 1878; inicialmente la enfermedad fue confundida con una forma septicémica aguda del cólera aviar hasta 1880, cuando Rivolto y Delprato las diferenciaron con base a características clínicas y patológicas. En 1901, Centanni y Savonuzzi determinaron que la causa de la enfermedad era un agente filtrable, pero el virus no fue identificado ni clasificado hasta 1955.<sup>1</sup>

En 1894 hubo un brote de IA en el norte de Italia, y éste fue diseminado vía comercialización de aves hacia Austria, Alemania, Australia y Bélgica. A mediados del siglo XX, la enfermedad causada por el virus IA hoy llamada de alta patogenicidad se había diseminado en casi toda Europa, Rusia, el norte de África, Medio Oriente, Asia, Sudamérica y Norteamérica. Los brotes involucrados entre 1901 y 1950s, fueron caracterizados años más tarde como causados por los virus subtipos H7N1 y H7N7 de alta patogenicidad. Un brote de influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) en aves comerciales en Escocia en 1959 y otro brote en golondrina marina común (*Sterna hirundo*) en Sudáfrica, involucraron nuevos subtipos de virus de IA, H5N9 y H5N3 respectivamente. Con este evento terminó la suposición de que todos los virus H5 y H7 eran altamente patógenos. Las formas menos patógenas de IA fueron reconocidas a mediados del siglo XX. Durante 1953-1963 IABP fue aislada de

patos domésticos con enfermedad respiratoria en Canadá, Checoslovaquia, Inglaterra y Ucrania.

En 1966 en Canadá fue aislado el subtipo H5 de IABP y en 1968 en Estados Unidos. Desde 1971 numerosos subtipos de H5 y H7 de IABP han sido aislados y caracterizados. Muchos de estos virus han sido aislados de aves silvestres asintomáticas, inicialmente por vigilancia serológica de aves acuáticas migratorias que mostraban evidencia de infección por virus de IA ó eran aisladas cuando se llevaba a cabo el programa de vigilancia para la enfermedad de Newcastle. Desde entonces, se ha demostrado que aves silvestres clínicamente sanas, principalmente del orden *Anseriformes* (patos, cisnes) y *Charadriiformes* (gaviotas) son reservorio asintomático de virus de IA.<sup>1,3</sup>

## **I.2 DISTRIBUCIÓN Y SALUD PÚBLICA**

Los virus de IA actualmente se encuentran distribuidos en todo el mundo. Los virus de influenza A H1N1, H2N2 y H3N2 causaron enfermedad respiratoria de gran impacto en humanos en el siglo XX, incluyendo la pandemia de 1918, 1957 y 1968.<sup>4</sup> Las cepas pandémicas tenían una nueva hemaglutinina (HA) derivada de aves u otros animales, con o sin otros genes de influenza aviar que esporádicamente emergen en humanos y tiene el potencial de causar una pandemia de influenza si el virus es capaz de transmitirse entre la población humana que, carece de inmunidad a la nueva HA.<sup>4</sup> En general el virus de IA se adapta y se transmite con facilidad entre individuos de la misma especie, ocasionalmente se transmite inter-especies estrechamente relacionadas; en raras ocasiones los virus de IA han mostrado transmisibilidad inter-especie a humanos. Experimentalmente, el virus de IA ha mostrado limitada habilidad para replicar en tracto respiratorio humano, este fenómeno es muy raro y aún así la transmisión de virus de IA a humano ha ocurrido. Casos de transmisión de influenza porcina a humanos ha sido reportada más frecuentemente que con virus de IA, aunque esto ha sido raro.

Esta leve diferencia de transmisibilidad entre virus de influenza porcina y de IA puede ser el resultado del receptor celular específico en el epitelio del tracto respiratorio. Los virus de IA se unen al ácido N-acetilneuroamínico ligado al ácido  $\alpha$ -2,3-galactosa, sobre los receptores de sialoligosacarido (ligado  $\alpha$ -2,3); mientras el virus porcino y humano preferencialmente se une al ácido N-acetilneuramínico ligado al ácido  $\alpha$ -2,6-galactosa, sobre los receptores de sialoligosacarido (ligado  $\alpha$ -2,6). El epitelio respiratorio de las aves tiene receptores  $\alpha$ -2,3; mientras que el epitelio respiratorio humano tiene receptores  $\alpha$ -2,6; el epitelio respiratorio porcino tiene una mezcla de receptores  $\alpha$ -2,3 y  $\alpha$ -2,6. Esto puede explicar en parte, el mayor número de reportes de transmisión de influenza porcina a humanos en comparación a los virus de IA.<sup>1</sup>

Han sido reportados cinco incidentes que involucran la transmisión de virus de IA a humanos. En 1959 un joven de 16 años desarrolló una hepatitis infecciosa a su regreso de un viaje en mar donde atravesó Asia, África y Europa, un virus de IAAP (H7N7) fue aislado de su sangre. Durante 1978-1979 un virus de IABP (H7N7) causó un brote de enfermedad respiratoria y muerte de focas al noreste de E. U; una conjuntivitis auto-limitante fue reportada en los trabajadores que manejaban a las focas durante el brote.<sup>1</sup> En 1996, fue aislado un virus de IABP (H7N7) de una mujer de 43 años de edad con conjuntivitis en Inglaterra, la mujer solía mezclar sus patos domésticos con unos silvestres en un pequeño lago.<sup>1</sup> En 1997 un virus de IAAP (H5N1) resultó en la hospitalización de 18 personas con el deceso de 6 en Hong Kong, los pacientes tuvieron fiebre, síntomas de enfermedad respiratoria y gastrointestinal incluyendo diarrea, vomito y dolor. Los pacientes que murieron tuvieron neumonía bilateral severa y otras complicaciones, disfunción hepática, falla renal, choque séptico, los virus de IA aislados de los pacientes fueron ligados a mercados de aves vivas, o granjas que experimentaron brotes de IAAP. En 1998-1999 un virus de IABP (H9N2) fue aislado de siete personas, entre 1 – 70 años de edad, en China y Hong Kong; en cinco personas no fue reportado sintomatología clínica, pero en dos fue reportado fiebre y enfermedad respiratoria.<sup>1,5</sup> El ministro de salud de Indonesia anunció un nuevo caso influenza aviar H5N1 en un hombre de 31 años que desarrolló los síntomas el 31 de octubre del 2007, fue hospitalizado el 3 de noviembre y tres días después falleció. De 113 casos de IA H5N1 en Indonesia, 91 han sido fatales.<sup>6</sup>

Aunque la probabilidad de que los virus IA se introduzcan en la población humana recombinándose y estableciéndose como un nuevo linaje de virus de influenza humana ha sido extremadamente raro; es consistente con el largo periodo de tiempo que pasó entre los casos de influenza humana pandémica y otra. Por ejemplo, análisis de la secuencia de nucleótidos ha determinado que en 1957 (H2N2) y 1968 (H3N2) los virus de influenza humana pandémica fueron el resultado de la recombinación de tres genes (HA, NA y PB1) y dos genes (HA y PB1) virales de IA, respectivamente. Los cerdos han sido propuestos como el vehículo del virus de influenza de aves y mamíferos donde se lleva a cabo la recombinación de éstos, desarrollando nuevas cepas que tienen la habilidad de infectar personas y otros mamíferos.<sup>1,4,7,8,9</sup>

### **I.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA**

Las pérdidas económicas por virus de IA han variado dependiendo de la cepa del virus, especie afectada, número de granjas involucradas, métodos de control utilizados y la velocidad de implementación de estrategias de control o erradicación. Generalmente las pérdidas más grandes han ocurrido durante epizootias de virus IAAP en pollos domésticos criados en granjas comerciales en áreas de producción intensiva o en sistemas de mercado de aves vivas.<sup>1,10</sup>

La FAO Emergency Centre for Transboundary Animal Diseases Operations (ECTAD) ha estimado que las pérdidas globales por IAAP desde 2003 asciende a billones de dólares. Solo el costo del brote en Hong Kong en 1997 estima pérdidas de 100 millones de dólares.<sup>11</sup>

### **I.4 INFLUENZA AVIAR EN MÉXICO.**

En Octubre de 1993, en unas granjas productoras de huevo para plato disminuyó su producción de huevo con una aumento en la mortalidad, esto fue asociado con un virus de IABP H5N2 por evidencia serológica. El virus causó solo un síndrome respiratorio leve en pollos libres de patógenos específicos, y fue aislado de pollos en Mayo de 1994, al tiempo que el virus había estado diseminándose en el país. Fue en este año cuando se identificó como IABP H5N2. En diciembre de 1994 y enero de 1995 en los Estados de Puebla y

Querétaro, experimentaron un incremento en la mortalidad y disminución de su producción de huevo, los virus aislados de esas aves con signos y lesiones sugestivos a IAAP fueron analizados y confirmados en el laboratorio. Actualmente SENASICA ha estimado las pérdidas ocasionadas por el brote de aquel entonces en 49 millones de dólares.<sup>12</sup>

La erradicación del virus por despoblación de granjas no fue considerada como una opción razonable; por lo que se optó por la vacunación; en ese entonces se desarrolló y utilizó una vacuna con virus inactivado. A pesar que se logró erradicar la IAAP, la presencia de virus BP sigue causando pérdidas esporádicamente y lleva el riesgo de poder mutar nuevamente a un virus de AP en cualquier momento. Actualmente la IA se encuentra bajo campaña gubernamental de control y erradicación (Norma Oficial Mexicana 044-ZOO-1995) empleando como inmunógenos tanto la vacuna de virus inactivado, como una vacuna recombinante de poxvirus aviar que expresa el gen de la hemaglutinina (HA)<sup>2,13,14</sup>

## **I.5 CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA**

La clasificación más antigua de los géneros de virus de influenza es con base en reacciones serológicas de sus proteínas internas (NP y M1), por medio de la técnica inmunoprecipitación, y se distinguen los géneros A, B y C. Todos los virus de influenza aviar pertenecen al género *influenzavirus A*; los *influenzavirus B* y *C* nunca han sido aislados de aves pero sí, causan enfermedades leves en humanos, cerdos y raramente en focas. A su vez, los *influenzavirus A*, se subclasifican con base a reacciones serológicas de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). Actualmente se reconocen 16 serogrupos de HA y 9 en la NA. La clasificación serológica se ha hecho por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinación, inhibición de la neuroaminidasa y seroneutralización. La mayoría de las combinaciones entre los 16 HA y 9 NA subtipos de IA, han sido reportados en aves domésticas y silvestres, y la distribución varía por año, por localización geográfica y especie hospedera.<sup>1,15</sup>

Los virus de influenza aviar también se clasifican en dos patotipos, con base a la infección que provoca en pollos y pavos: (1) baja patogenicidad (BP), puede ser cualquier serotipo, en cualquier combinación, asociado con infección asintomática, enfermedad respiratoria leve, aunque algunos virus BP pueden causar alta mortalidad en asociación con patógenos secundarios; (2) alta patogenicidad (AP), solo se han identificado los serotipos H5 y H7, que está registrada en la Lista "A" de enfermedades exóticas, de acuerdo a la Oficina Internacional de Epizootias, (World Organization for Animal Health) y causa enfermedad sistémica severa, resultando en alta mortalidad (75-100%).<sup>16,17</sup>

## **I.6 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR**

El virus de IA está clasificados en la familia *Orthomyxoviridae*, género *influenzavirus A*. Los virus son típicamente esféricos o pleomórficos, pero también pueden ser filamentosos. El tamaño del virión tiene un rango en diámetro entre 80-120nm, la superficie del virus está cubierta por dos tipos de proyecciones glicoprotéicas: a) trímero en forma de barra o hemaglutinina, y b) tetrámero en forma de hongo o neuraminidasa. La nucleocápside es helicoidal y el genoma viral está compuesto por 8 segmentos de RNA de cadena simple y en sentido negativo, que codifica para 10 proteínas. Ocho de las proteínas son constituyentes del virus (HA, NP, NA, PB1, PB2, PA, M1, M2); y las dos proteínas no estructurales que (NS1 y NS2) que están localizadas en el citoplasma de la célula huésped, aunque recientemente se ha descubierto que NS2 también es componente menor en el virión.<sup>1</sup> Los viriones están compuestos de 0.8-1.0% de RNA, 5-8% de carbohidratos, 20% lípidos y 70% proteína. Los carbohidratos están contenidos dentro de los glicolípidos y glicoproteínas e incluyen galactosa, manosa, fucosa y glucosalina; Los lípidos están presentes en la envoltura del virus y son derivados de la membrana celular del huésped, la mayoría de los lípidos son fosfolípidos, pero pequeñas cantidades de colesterol y glicolípidos están presentes. El genoma viral especifica las proteínas y sus sitios potenciales de glicosilación.<sup>1,15</sup>

El virus es termolábil (56°C/30'), en materia orgánica (heces, cama, etc.), resiste hasta 100 días. Debido a que es un virus envuelto es inestable al medio ambiente y es relativamente sensible a los solventes lipídicos, como los detergentes, su infectividad es rápidamente destruida con formalina, B-propiolactona, agentes oxidantes, diluentes ácidos, eter, hidroxilamina, desoxicolato de sodio, iones de amonio y duodecilsulfato; el virus es inactivado por calor, pH extremo, condiciones no isotónicas y sequedad.<sup>1</sup>

### **I.6.1 Glicoproteína HA**

La hemaglutinina fue originalmente nombrada así debido a la característica de los virus para aglutinar eritrocitos al unirse a ácido sialico ubicado en los receptores. La HA tiene tres conocidas funciones durante el ciclo de replicación de los virus: 1) se une al ácido sialico ubicado en los receptores sobre la superficie celular, atrayendo la partícula viral a la célula; 2) es responsable de la penetración de los virus dentro del citoplasma de la célula blanco mediante fusión de la membrana formando el endosoma junto con la partícula viral, lo cual permite que la nucleocápside viral sea liberada en el citoplasma y 3) es uno de los antígenos más importantes de los virus contra el cual se producen anticuerpos neutralizantes, y la epidemiología del virus está asociada con cambios en su estructura antigénica. La HA es codificada por el segmento 4 (gen HA) que varía en tamaño de 1742 -1778pb) y codifica para un polipéptido de 562 ó 566 residuos.<sup>15</sup>

Aunque el gen HA es el determinante primario de la patogenicidad, la apropiada constitución de los 8 genes es requerida para la máxima expresión de virulencia. La activación proteolítica post-traducciona del precursor HA<sub>0</sub> que se divide en las subunidades HA<sub>1</sub> y HA<sub>2</sub> es esencial en la infectividad del virus y su diseminación a través del organismo<sup>18,19</sup>

Las HAs de virus IABP usualmente son cortadas solo en un limitado número de células, por lo tanto estos virus solo causan infecciones localizadas en el aparato respiratorio, tracto intestinal o ambos, resultando en una infección asintomática o leve. En contraste, las HAs de virus IAAP son cortadas por un amplio número de tipos celulares, lo que resulta en una infección sistémica.<sup>18</sup>

Dos características estructurales determinan el corte de la HA: La secuencia de aminoácidos en el sitio de corte y los carbohidratos aledaños. La secuencia

de aminoácidos de virus IABP muestra que las HAs presentan una restricción al corte de las mismas y usualmente tienen una arginina; las secuencias de aminoácidos presentes en el sitio de corte de las HAs de los virus IAAP tiene múltiples aminoácidos situados inmediatamente río arriba al sitio de corte, lo cual confiere a las HAs ser cortadas fácilmente.<sup>18,19,20</sup>

Dos grupos de proteasas (exógenas y endógenas) son responsables de cortar la HA, las exógenas cortan las HAs con una arginina en el sitio de corte de los virus IABP, así como también corta las HAs con múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte de los virus IAAP. Estas proteasas exógenas son conocidas como tripsinas. El segundo grupo de proteasas (endógenas) cortan en el sitio de corte de HAs con sus múltiples aminoácidos básicos, solo en virus de AP. De este tipo de proteasas se pueden mencionar las de tipo subtilisina como la furina y PC6.<sup>1,18,19,21,22</sup>

### **I.6.2 Mutaciones**

Los virus de influenza presentan variaciones antigénicas debido a dos fenómenos de mutación: La derivación y el cambio antigénico. La derivación antigénica, implica mutaciones de punto en los genes que codifican para las glicoproteínas (HA y NA). Este tipo de mutación es la más frecuente debido que la ARN polimerasa tiene una alta tasa de error durante la replicación del genoma.

Los cambios antigénicos también pueden presentarse debido a alteraciones genéticas de orden mayor en el genoma, esto es debido a la naturaleza segmentada del genoma viral, que permite que los segmentos se segreguen cuando dos virus diferentes de influenza coinfectan una misma célula, pudiendo general 256 posibles virus recombinantes genéticamente distintos; como ejemplo tenemos el virus H5N1 de Hong Kong, se sabe que este virus surgió de una recombinación entre virus aviares (H5N1, H6N1, H9N2). Afortunadamente, las enfermedades zoonóticas resultantes de la transmisión de virus entre especies son raras, como la infección de virus H5N1 aviares a personas.<sup>1,19,23,24,25,26</sup>

### **I.6.3 Replicación del virus**

Los virus de IA se adsorben en la célula huésped gracias a la unión de la HA con su receptor celular específico que contiene ácido siálico, lo que resulta en endocitosis, una vez en el endosoma, el pH bajo promueve la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma, posteriormente la nucleocápside viral es transportada al núcleo, donde el complejo viral transcriptasa sintetiza ARNm. Seis ARNm monocistrónicos son producidos en el núcleo y transferidos hacia el citoplasma para la traducción de las 6 proteínas (HA, NA, NP, PB1, PB2 y PA). Los ARNm de los genes NS y M cada uno produce a su vez dos ARNm, los cuales son traducidos en las proteínas NS1, NS2, M1 y M2. Las proteínas HA y NA son glicosiladas en el retículo endoplásmico rugoso, cortadas en el aparato de Golgi, y transportadas a la superficie cuando son embebidas en la membrana plasmática. Los 8 genes virales se ensamblan con las proteínas virales internas y el ARN, el virus sale de la célula por gemación de la membrana plasmática que contiene integradas las proteínas HA, NA y M2. La proteína M1 promueve la asociación con la membrana plasmática y cierre de ésta, terminando con la liberación de los virus.<sup>1</sup>

### **I.7 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Recientemente, la mayoría de los procedimientos comúnmente usados en amplificación de genes, requiere la producción de un ADN complementario (ADNc) proveniente de ARNs celular ó ARN genómico de algunos virus. Posterior a este paso, la habilidad para sintetizar grandes cantidades de fragmentos de ADN específicos ha facilitado significativamente el subsecuente análisis. En pocos años desde su introducción, la PCR se ha diseminado ampliamente como técnica de investigación. El número de investigadores que la utilizan han aumentado exponencialmente y probablemente continúen haciéndolo hasta que en un futuro cercano algún otro método la substituya . Esta popularidad se debe a su aparente simplicidad y alta probabilidad de éxito.<sup>1</sup>

La detección de patógenos infecciosos y la identificación de variación genética asociada con enfermedad ha sido revolucionada por el uso de pruebas específicas de amplificación de ADN y la secuenciación de nucleótidos. . La PCR ha ayudado potencialmente a realizar bases diagnósticas produciendo el material genético suficiente de una manera simple y rápida.<sup>27</sup>

## **I.8 SECUENCIACIÓN**

Hay dos procedimientos muy exitosos, de uso generalizado, para la secuenciación de ADN. Ambos dependen de la separación de fragmentos que difieren en su longitud en solo un nucleótido el cual es conocido (A, T, G ó C). El primero, inventado por Allan Maxam y Walter Gilber, fragmenta químicamente muestras de ADN marcadas en el extremo; el segundo y más ampliamente utilizado, fue el desarrollado por Fred Sanger y sus colaboradores, utiliza la síntesis enzimática para extender una secuencia corta de DNA marcado en el extremo. La secuenciación moderna del ADN es muy sencilla y se aplica con exactitud a largas regiones; ya se han secuenciado los genomas totales de muchos virus y otros microorganismos como el de *E. coli*.<sup>28</sup> La secuenciación directa de productos de PCR tiene dos grandes ventajas sobre la clonación convencional de fragmentos de PCR dentro de plásmidos y genomas virales: 1) Esta puede ser más fácilmente estandarizado y con esto más fácilmente automatizado, ya que es un método *in vitro* y no depende de un organismo vivo (virus, bacteria), y 2) es más rápido y más confiable con solo una secuencia simple que necesita ser determinada por cada muestra. La facilidad con la cual se editan secuencias y puede ser obtenida directamente, sin clonar en bacterias, el éxito de ésta técnica esta determinado por: a) la habilidad de los iniciadores de amplificar solo el fragmento deseado durante la PCR, y b) el método usado para obtener el molde de ADN que se va a secuenciar.<sup>27</sup>

## **I.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICO**

Los estudios de genética evolutiva tienen dos objetivos principales: la reconstrucción de filogenias y el análisis de poblaciones. Desde 1962, cuando Zuckerkandl y Pauling propusieron que la comparación de las secuencias de proteínas y genes podría ser usada como un reloj molecular como dato de divergencia de las especies existentes, una variedad de marcadores moleculares han sido utilizados para estudios filogenéticos. Al día de hoy los árboles filogenéticos aparecen frecuentemente en estudios moleculares; su inclusión refleja el creciente reconocimiento de la filogenia como herramienta por entender procesos biológicos, analizar secuencias relacionadas entre sí, expresando el porcentaje de identidad o de similitud.<sup>29</sup>

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Aunque México logró erradicar la influenza aviar AP, la presencia de virus BP establece el riesgo de poder mutar nuevamente a un virus de AP en cualquier momento.<sup>2,13,14</sup>

Desde 1994, ha estado circulando diferentes subtipos de H5 y H7 BP en mercados de aves vivas en E.U.A; estos lugares constituyen un reservorio importante para los virus de influenza aviar, ya que no cuentan con medidas de bioseguridad y se puede encontrar una gran variedad de aves, incluyendo pollos, pavos, aves de caza y patos. Esto es un grave problema debido a que frecuentemente estos virus infectan granjas cercanas con millones de aves. En un estudio filogenético realizado en 36 mercados, que abarcó 3 estados del país, demostró que los virus no solo presentaron derivación antigénica, sino también recombinación antigénica, generando nuevos virus. Aunque es difícil saber que consecuencias epidemiológicas y médicas se traerán en un futuro, es claro que existe un enorme nivel de variación genética.<sup>17</sup>

Aunque el virus H5N2 que actualmente existe en México es de BP, no se conoce su evolución molecular de los últimos años. Chang-Won Lee y colaboradores demostraron que los virus de influenza aviar BP mexicanos han estado mutando desde el tiempo en que fue introducida la vacunación, por lo tanto es posible inferir que las vacunas elaboradas en aquella época, actualmente no funcionen igual. Chang-Won Lee y colaboradores demostraron

que la secuencia de aminoácidos de la cepa vacunal tenía una diferencia de 20 a 27 aminoácidos con respecto a las 52 cepas aisladas en México, 6 cepas de Guatemala y 2 del Salvador en los años 1994 a 1998. Los resultados del estudio sugieren que los virus de influenza aviar mexicanos están experimentando derivación antigénica, y es probable que se deba a presión por vacunación.<sup>13</sup>

Los virus de IAAP subtipos H5 y H7 emergen a intervalos irregulares y pueden eliminar gran cantidad de pollos rápidamente. Análisis filogenéticos indican que estos virus no constituyen un linaje único, sino más bien provienen de linajes de virus de BP provenientes de aves silvestres acuáticas. El sitio de corte de la HA, contiene una serie de aminoácidos básicos que pueden ser utilizados para distinguir virus potencialmente patógenos de los virus de BP.<sup>30</sup>

Se sabe que no solo la presencia de éstos aminoácidos básicos en el sitio de corte de la HA, pueden transformar un virus de BP a AP, existen otros dos mecanismos: eventos de inserción o substitución, o cambios de glicosilación que permiten al sitio de corte de HA estar más accesible a proteasas endógenas.<sup>20,21,22</sup>

Se ha evaluado que la eficacia de las vacunas depende del grado de relación antigénica existente entre la hemaglutinina de las vacunas con la de las cepas desafiantes. Así, en un estudio se evaluaron tres diferentes vacunas, una inactiva emulsionada, y dos recombinantes que llevan insertado el gen de la hemaglutinina, una emplea como vector un poxvirus, y la última emplea como vector un baculovirus. Al inmunizar con estas vacunas y después desafiar aves con diferentes virus de influenza aviar AP, se observó que las vacunas emulsionadas y recombinantes con un alto grado de similitud a la hemaglutinina de los virus desafiantes, protegieron a las aves de signos clínicos y muerte, además disminuyó el número de pollos que excretaron el virus, tanto de la orofaringe como de la cloaca, sugiriendo que la vacunación tiene la capacidad de reducir la contaminación ambiental por el virus de influenza aviar y prevenir la subsiguiente transmisión ave a ave. En cambio, al usar la vacuna de baculovirus que no tenía un alto grado de similitud en la hemaglutinina a los virus desafiantes, esta pudo proteger contra signos clínicos y muerte, pero todos los pollos excretaron el virus. Este estudio muestra que

cuando la similitud es menor al 90% en la glicoproteína HA, entre vacunas y virus desafiantes, la vacuna puede evitar signos clínicos, más no evita la replicación del virus en el aparato respiratorio de las aves, liberando el virus al ambiente. Por lo anterior es fundamental la vigilancia de los cambios antigénicos que se presentan en las cepas de campo y ajustar periódicamente la antigenicidad de las vacunas. Lo cual implica que los virus de influenza aviar entre las parvadas continúan cambiando molecular y antigénicamente.<sup>18,23</sup> Es importante conocer la evolución molecular del virus H5N2 BP en México año con año, para poder evaluar las estirpes de diferenciación genética viral que están apareciendo. Estas diversas estirpes pueden desarrollar cambios antigénicos que tendrían que ser incorporados en las vacunas, actualizarlas y así mejorar su capacidad de protección. Es sumamente importante la contención y erradicación de las cepas de BP prevalentes en México. Por un lado debido a las pérdidas económicas que ocasionan directa e indirectamente; y por otro, siempre existe el riesgo de que el virus mute a AP.

### **III. HIPÓTESIS**

Los virus de IA evolucionan continuamente lo que sugiere que los virus aislados en los últimos años en México han divergido considerablemente de las cepas que aparecieron hace 13 años.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el grado de evolución molecular que han tenido los aislados actuales del virus de influenza aviar en México.

### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Amplificar por RT-PCR el gen que codifica para la glicoproteína HA de muestras de virus de influenza aviar aislados en México de los años 2005-2006.
- 2.- Obtener la secuencia de nucleótidos del gen HA amplificado.
- 3.- Determinar las relaciones genéticas existentes entre los aislados del virus de IA del 2005-2006 con las variantes anteriores y la cepa vacunal.

## **VI. METAS**

- 1.- Obtener el ARN viral a partir de líquido alantoideo de embriones de pollo infectados con 35 cepas del virus de IA aislados en los años 2005 - 2006
- 2.- Amplificar por RT-PCR el gen que codifica para HA.
- 3.- A partir del segmento amplificado del gen HA obtener la secuencia completa del gen de HA para cada aislado.
- 4.- Efectuar un análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, para establecer las relaciones evolutivas entre los distintos aislados y entre aislados virales previamente descritos.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

### VII.1 OBTENCIÓN DE VIRUS:

Los 36 aislados del virus de IA BP fueron proporcionados por el Laboratorio de Alta Seguridad del CPA, a partir de una selección de cerca de 100 aislados de virus de IA de los años 2005 y 2006 (Cuadro 1)

**Cuadro 1. Procedencia de los 36 aislados del virus de influenza aviar y la estirpe genética a la cual fue asignada en el análisis filogenético.**

ID. LAB. GENET	ESTIRPE GENÉTICA	ENTIDAD
M14	A	HIDALGO
M26	A	HIDALGO
M9	A	EDO. DE MEXICO
M41	A	MICHOACAN
M19	A	VERACRUZ
M36	A	VERACRUZ
M8	A	DESCONOCIDO
M42	B	AGUASCALIENTES
M31	B	CHIAPAS
M13	B	DURANGO
M39	B	MICHOACAN
M39	B	MICHOACAN
M16	B	DESCONOCIDO
M17	B	DESCONOCIDO
M2	C	COAHUILA
M1	C	QUERETARO
M10	C	QUERETARO
M11	C	QUERETARO
M15	C	QUERETARO
M29	C	QUERETARO
M44	C	DURANGO
M34	C	DESCONOCIDO
M12	D	DURANGO
M30	D	DURANGO
M46	D	DURANGO
M47	D	DURANGO
M48	D	DURANGO
M20	D	MEXICO
M32	D	DESCONOCIDO
M6	E	COAHUILA
M28	E	COAHUILA

### Continuación Cuadro 1

ID. LAB. GENET	ESTIRPE GENÉTICA	ENTIDAD
M38	E	COAHUILA
M3	E	DURANGO
M5	E	DURANGO
M27	E	DURANGO
M45	E	DURANGO
M49	VIRUS DE ALTA PATOGENICIDAD	

\* (A-E) Estirpes genéticas indicada en la filogenia del virus. Ver Fig. 4

### VII.2 EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL

Debido a la importancia de la enfermedad de IA en México, solo algunos laboratorios autorizados por la SAGARPA pueden manipular virus de IA vivos; por tal razón el laboratorio CPA se encargó de propagar los virus, coleccionar el líquido alantoideo y su posterior inactivación con trizol. A partir de estos líquidos alantoideos conteniendo virus de IA inactivado se procedió a la extracción de ARN. Brevemente, se mezclaron 500µl de líquido alantoideo con 1000 µl de trizol®, se mezcló suavemente y se incubó en hielo 10 minutos, se agregaron 200µl de cloroformo y se agitó en vortex 15 segundos. Se centrifugó a 11000 g (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra 25R) durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa a la que se le agregó 1 volumen de isopropanol frío. Se incubó a -20°C por 30 minutos; se centrifugó a 11000 g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70% DEPC frío. Se centrifugó a 11000g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla en speedvac (Heto Lab Equipment) en vacío a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 20 µl de agua DEPC y se congeló a -85°C hasta su utilización. (De acuerdo con las especificaciones del fabricante).

### VII.3 SÍNTESIS DE ADNc DEL GEN HA

Los iniciadores utilizados en este estudio se encuentran descritos en la Tabla 2. Se empleó el ARN obtenido del líquido alantoideo para efectuar una reacción de transcriptasa reversa (RT); la que se llevó a cabo de la siguiente manera: Se utilizó como iniciador el oligonucleótido HAF (sentido). En un volumen de reacción de 20µl, se utiliza de 1ng a 5µg de RNA total, 2µl de dNTP's Mix

Fermentas (1mM), 2µl de iniciador específico (5mM) y agua dietil pirocarbonato (DEPC). Se mezclaron los componentes y se incubó a 70°C por 5 minutos, cuando bajó la temperatura a 4°C se agregó 4µl de buffer M-MuLV RT (Fermentas) 5X (1X), 0.5µl de RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas) (20u), subió la temperatura a 37°C y se agregó 1µl de RevertAid H Minus M-MuLV RT (Fermentas) 200u. Se incubó a 42°C por 1hr. (De acuerdo con las especificaciones del fabricante).

#### **VII.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN HA DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR**

El gen HA se amplificó en 3 segmentos : **G1**, **G2** y **P** (Figura 1) con los siguientes iniciadores: fragmento **G1**- IANF (sentido) y IAR2 (reversa) que amplificaron un fragmento de 890pb, el fragmento **G2**-IAF1 (sentido) y IAR1(reversa) que amplificaron un fragmento de 899pb y el fragmento **P**-IAF2-(sentido) y IANR-(reversa) que amplificaron un fragmento de 838pb (Cuadro 2). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador de tapa caliente de gradiente (Hybad PCR Express); en cada reacción se incluyó: 5µl de muestra de ADNc, 2mM de MgCl<sub>2</sub> (Biogénica), 0.2mM de dNTP mix (Biogénica 200µM) , 2.5 U de Taq polimerasa (Amplificasa Biogénica EA 500), 0.5µM de iniciador sentido y 0.5µM de iniciador reversa, 1X de Amortiguador de PCR 10X (Biogénica EA 500), H<sub>2</sub>O cbp 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C para el fragmento G1, y 52°C para los fragmentos G2 y P, por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 72°C por 15 minutos.<sup>31</sup>

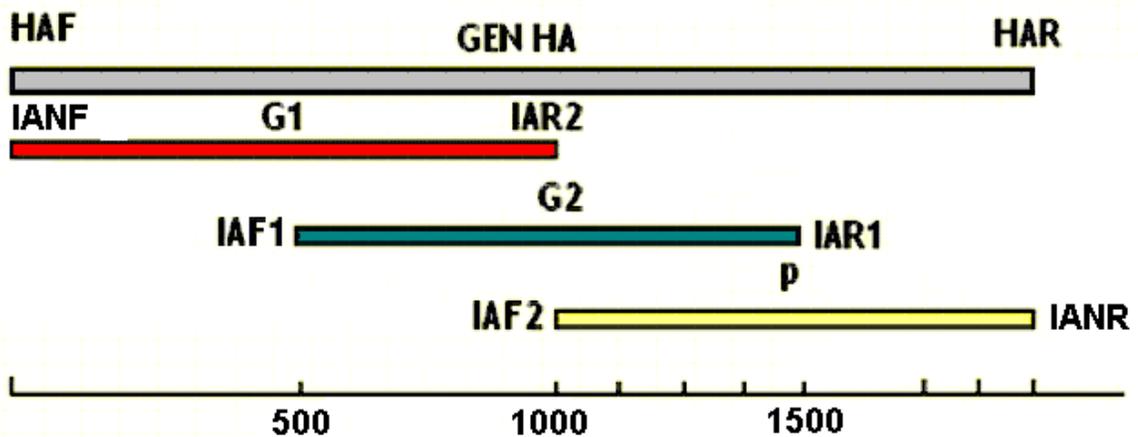


Figura 1. Se muestra los 3 fragmentos que se amplifican con los diferentes pares de oligonucleótidos del gen HA.

**Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en el estudio para reacciones de RT-PCR y secuenciación.**

Nombre	Secuencia	Posición en el gen HA	
HAF	5'-AGCAAAGCAGGGGTACCAG-3'	1	20
HAR	5'-AGTAGAAACAAGGGTGTTTTAATTAC-3'	1741	1767
IANestF	5'-AAGCAGGGGTACCAGATATC-3'	6	25
IANestR	5'-GGTGTTTTTAATTACAATCTGAAC-3'	1732	1755
IAF1	5'-TCCAACCATGATGCCTCATC-3'	443	462
IAF2	5'-CCAGTGGGTGCTATAAATTC-3'	917	936
IAF3	5'-CAAGAACTTATACGATAAGG-3'	1399	1418
IAR1	5'-GCATTGTAAGTCCATACATC-3'	1322	1341
IAR2	5'-GTTACCATAATTCAGTTCAC-3'	876	895
IAR3	5'-GTTGGACCAAGAGCTCCTAGG-3'	428	448
IAR4	5'-GTGCTGCTCATTAATGCTTCAG-3'	349	371

\*Los pares de oligonucleótidos IANestF + IAR2 (G1) amplifican un segmento del gen HA de 890pb, IAF1 + IAR1 (G2) amplifican un segmento de 899pb y los oligonucleótidos IAF2 + IANestR amplifican un segmento de 838pb.

## **VII.5 EVALUACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE LOS SEGMENTOS DEL GEN HA**

Se utilizaron 3µl de los productos de PCR de los respectivos fragmentos (G1, G2 y P) fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Vivantis Agarose Biochemical AG6330) a 100 voltios por 1 hora en una cámara de electroforesis horizontal (CLP Continental Lab Products) y teñidas con bromuro de etidio (1µg/ml). Las bandas de ADN fueron visualizadas en un trasluminador UV. Se utilizó un marcador de tamaño molecular λ digerido con BsTEII (Biogénica).<sup>31</sup>

## **VII.6 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PARA SECUENCIACIÓN**

El resto de los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (1µg/ml), visualizadas en luz UV, se cortaron las bandas y se purificaron mediante perlas de sílica; las bandas previamente cortadas fueron pesadas y posteriormente se le agregaron 3 volúmenes de yoduro de sodio 6M y se incubaron a 55°C hasta la disolución del agar, se le adicionó 30µl de perlas de sílica y se incubaron a 4°C durante 1 hr. Las muestras se centrifugaron a 11000 g 4°C por 5 minutos (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra 25R), se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con solución de lavado 1X (NaCl 50mM, Tris HCl pH7.5 10mM, EDTA 2.5mM, etanol 50% v/v), se centrifugó nuevamente y se repitió el lavado, posteriormente las muestras se colocaron en el speed vac (Heto Lab Equipment) hasta estar completamente secas y se les añadió 30µl de agua estéril, se incubaron en el termo block a 55°C durante 5 minutos y se centrifugó a 11000 g a temperatura ambiente. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su utilización.<sup>32</sup>

## **VII.7 SECUENCIACIÓN**

A partir de las muestras de ADNs purificados, se llevaron a cabo 8 reacciones de secuenciación por cada aislado, utilizando los iniciadores anteriormente mencionados además de los iniciadores IAF3 (sentido), IAR3 (reversa) y IAR4 (reversa).

Las reacciones se llevaron a cabo en 20µl, donde se incluyó 20ng de ADN, se empleó un juego de reactivos comercial (BigDyle Applied Biosystems

Terminador v3.1). Las condiciones de secuenciación fueron: 25 ciclos de 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos y 60° C por 4 minutos. Los productos de secuenciación fueron purificados por el método de precipitación y fueron leídos en un secuenciador automatizado (Applied Biosystems) en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaria de Salud. (De acuerdo con las especificaciones del fabricante).

#### **VII.8.PURIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.**

Mediante la técnica de precipitación se purificaron los productos de las reacciones de secuenciación, en tubos de 1.5 ml se colocó la reacción de secuenciación y se le agregó 5µl de EDTA 125mM y 60 µl de etanol absoluto; se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se centrifugó a 11000 g a 4°C durante 10 minutos (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra 25R) e inmediatamente después se decantó el sobrenadante y se agregó 60 µl de etanol al 70% y se mezcló. Se centrifugó nuevamente e inmediatamente después se decantó y se secaron en el speed-vac (Heto Lab Equipment), se protegieron de la luz y se enviaron a leer por un secuenciador, (Applied Biosystems) (De acuerdo con las especificaciones del fabricante).

#### **VII.9.LECTURA DE SECUENCIAS, EDICIÓN Y ELABORACIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS**

Para cada aislado viral, las secuencias parciales se ensamblaron, editaron y se generó una secuencia consenso empleando el software ChromasPro version 1.33 (Technelysium Pty Ltd; Tewantin QLD; <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Las secuencias consenso de los aislados se analizaron para:

a) Establecer las diferencias genéticas en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos entre los aislados virales en relación a una secuencia consenso y con respecto a una cepa vacunal de IA mexicana de baja patogenicidad aislada en 1994 (A/chicken/Hidalgo/28159-232/1994; número de acceso a GenBank CY006040). Estas diferencias genéticas se determinaron por alineamiento de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos empleando en el sistema de computo Clone Manager Professional Suite, Versión 8.0 (Scientific & Educational Software).

b) Efectuar un estudio de relaciones genéticas, a nivel de secuencia de aminoácidos, entre los aislados virales mexicanos y aislados previamente estudiados en México en los años 1994-2001.<sup>17</sup> Estas relaciones genéticas se determinaron mediante un análisis filogenético empleando la metodología de Neighbor-Joining. Este fue computado por el sistema de cómputo MEGA 3.1 (S Kumar, K Tamura, and M Nei (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163. <http://www.megasoftware.net/>).

c) Identificar los caminos de diferenciación genética que presenta el virus de IA en México y determinar cuáles son las cepas más adecuadas para emplearse como vacunas.

## **VIII. RESULTADOS**

De 44 muestras de virus de IA, solo 36 resultaron positivas a la presencia del virus mediante el aislamiento en embrión de pollo y evidencia con glóbulos rojos al 2%. Este procedimiento fue llevado a cabo en el laboratorio de alta seguridad CPA.

### **VIII.1.- Amplificación del gen HA por PCR**

Posterior a estas metodologías previamente descritas, se llevaron a cabo las reacciones de PCR de las 36 muestras. Al principio del estudio se amplificó el gen completo (1767pb) de 5 muestras; utilizando el juego de iniciadores HAF+HAR, IANF+IANR y IANF+HAR, se obtuvieron algunas bandas, algunas coincidieron con el peso molecular esperado y otras bandas fueron inespecíficas, aún así las reacciones posteriores no fueron consistentes (Figura 2). Se cambió de estrategia y amplificó el gen en dos reacciones de PCR que generan dos fragmentos que se traslapan, para lo cual se utilizaron los juegos de iniciadores de la siguiente manera: IANestF+IAR1 (1322pb), IANestR+IAF1 (1313pb) y IANestR+IAF2 (P) (838pb); el fragmento de 1322pb amplificó solo en 4 ocasiones, el fragmento de 1313pb no amplificó, y el fragmento de 838pb amplificó.

Posterior a estos resultados se cambió nuevamente la estrategia pretendiendo para cada muestra generar 3 fragmentos que se traslapan considerando el fragmento de 838pb que previamente había amplificado nombrándolo como

fragmento P. Se llevaron a cabo otras dos amplificaciones generando los fragmentos G1 (890pb) y G2 (899pb). (Figura 3).

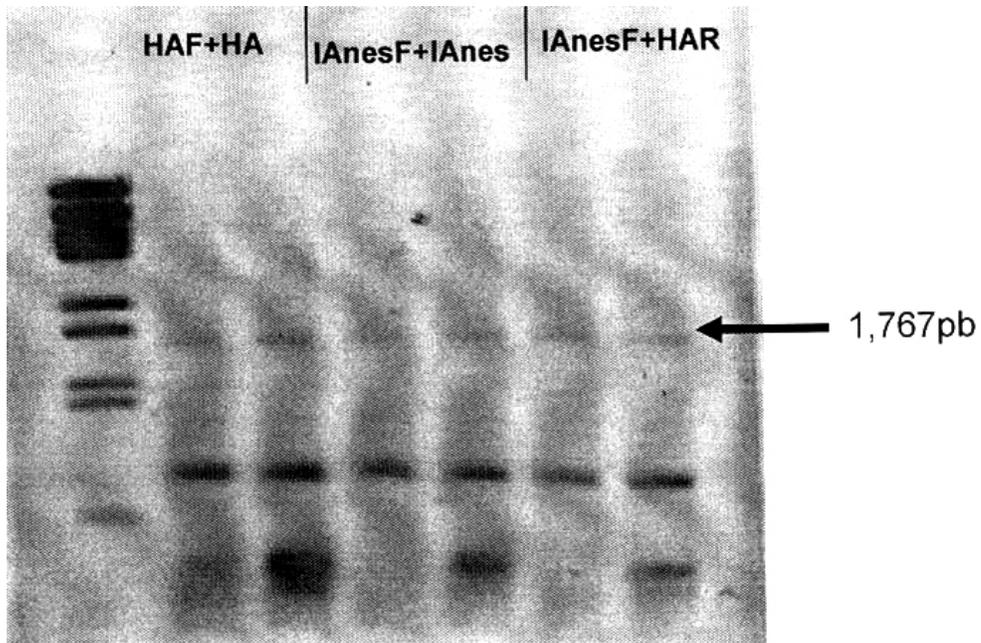


Figura 2. Resultado de la electroforesis en un gel de agarosa al 1% en donde se muestran los productos de amplificación obtenidos a partir del cDNA del gen HA del virus IA con los iniciadores HAF+HAR, IANestF+IANestR, HAF+IANestR. Se aprecia señalada la banda de amplificación del gen HA con los diferentes juegos de oligonucleótidos. Además de la banda amplificada del gen HA, se aprecian bandas inespecíficas.

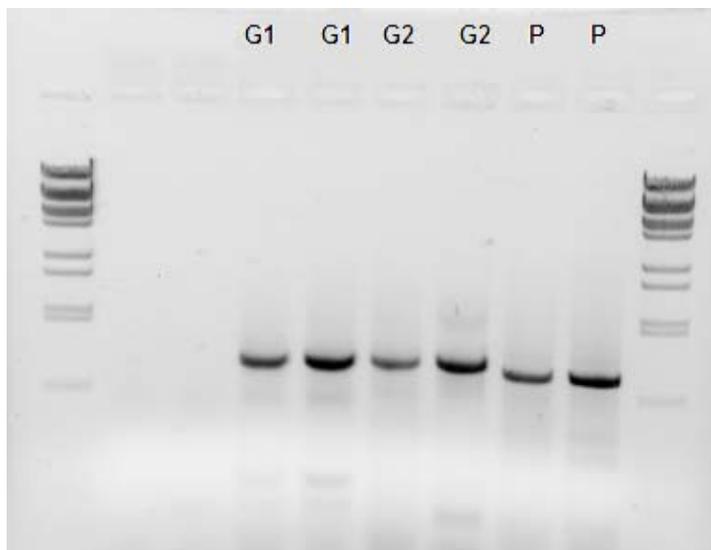


Figura 3. Productos de amplificación del gen HA empleando los oligonucleótidos a) IANestF+IAR2 (**G1**), b) IAF1+IAR1 (**G2**) y IANestR+IAF2 (**P**), las condiciones de reasociación de G1 fue de 48°C, G2 y P a 52°C. A éstas temperaturas los oligonucleótidos de estos 3 fragmentos generaron bandas únicas y abundantes.

### **VIII.2.- Secuencias de nucleótidos del gen HA de 36 aislados.**

Para cada aislado, se obtuvieron los 3 fragmentos amplificados (G1, G2 y P). Con estos fragmentos se generaron 8 secuencias parciales del gen HA, que se translanan en ambas cadenas. Se busco tener al menos en cada región del gen una lectura en ambas direcciones. Estas lecturas se editaron y se generó una secuencia consenso por cada aislado; empleando el software ChromasPro version 1.33 (Technelysium Pty Ltd; Tewantin QLD; <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). En la figura 4 se muestra un ejemplo de cómo se alinean las diferentes lecturas a lo largo de un segmento del gen HA y se genera una secuencia consenso.



Figura 4. Secuencia consenso del aislado 27 generada a partir de secuencias parciales.

### VIII.3.- Comparación de secuencias

Las secuencias completas del gen HA de 35 aislados del virus de IA se compararon con referencia a la cepa vacunal mexicana de IA de BP de 1994 (Hidalgo/28159-232/1994; No. de acceso GenBank CY006040). En estos análisis se omitió el aislado número 49, debido a que este virus corresponde a una cepa de referencia de alta patogenicidad aislada en 1994. Este análisis consiste en alinear todas las secuencias entre si. El resultado de esta alineación de las secuencias de nucleótidos se presenta en los cuadros como Alineación L nt.HTM, y el resultado de alineación de aminoácidos como Alineación L aa.HTM.

Las secuencias completas del gen HA de los 36 aislados del virus de IA se alinearon entre si. Este alineamiento se muestra en el Anexo 1.

### VIII.4.- Relaciones genéticas entre los aislados mexicanos.

Con las traducciones predichas de aminoácidos a partir de las secuencias de nucleótidos completos del gen de HA de los 35 aislados se efectuó un análisis filogenético generando un dendrograma (Figura 5), en donde se grafican las relaciones genéticas existentes entre los diferentes aislados. En estos análisis se omitió el aislado número 49, debido a que este virus corresponde a una

cepa de alta patogenicidad de referencia aislada en el 2004. Se puede apreciar la existencia de 5 líneas de diferenciación genética (a-e). Sin embargo, se consideró la topología de las líneas de diferenciación que han seguido los aislados virales, estas 5 líneas de diferenciación genéticas pueden reducirse a solo 3 estirpes principales (grupos **I**, **II** y **III**).

Las cepas que conforman el **grupo a** son 7 aislados: 8, 36, 14, 9, 41, 19, 26.

Las cepas que conforman el **grupo b** son 6 aislados: 42, 16, 31, 17, 13, 39.

Las cepas que conforman el **grupo c** son 8 aislados: 2, 34, 10, 11, 15, 29, 44 y 1.

Las cepas que conforman el **grupo d** son 7 aislados: 48, 30, 12, 20, 32, 46 y 47.

Las cepas que integran el **grupo e** son 7 aislados: 5, 27, 38, 6, 28, 45 y 3.

En el cuadro 3 se muestra el porcentaje de similitud de nucleótidos de cada aislado en relación a la cepa de referencia, indicando el número de nucleótidos que fueron iguales y cuales resultaron diferentes. En el cuadro 4 se muestra igualmente el porcentaje de identidad de los aislados pero a nivel de aminoácidos.

Se aprecia que el grado de similitud de nucleótidos varía entre un 91 y 92 %, en cambio el grado de similitud a nivel de aminoácidos varió entre el 90 y 88%. Esto representa entre 122 y 145/1695 nucleótidos de diferencia y entre 51 y 66/566 aminoácidos distintos.

Sin embargo, si comparamos las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de las cepas mexicanas con un aislado número 15 que está a la mitad de las relaciones genéticas entre todas las cepas, estas difieren entre si entre el 2% y el 7%, con 2 y 34 aminoácidos diferentes y difiriendo entre 14 y 110 nucleótidos (cuadros 5 y 6).

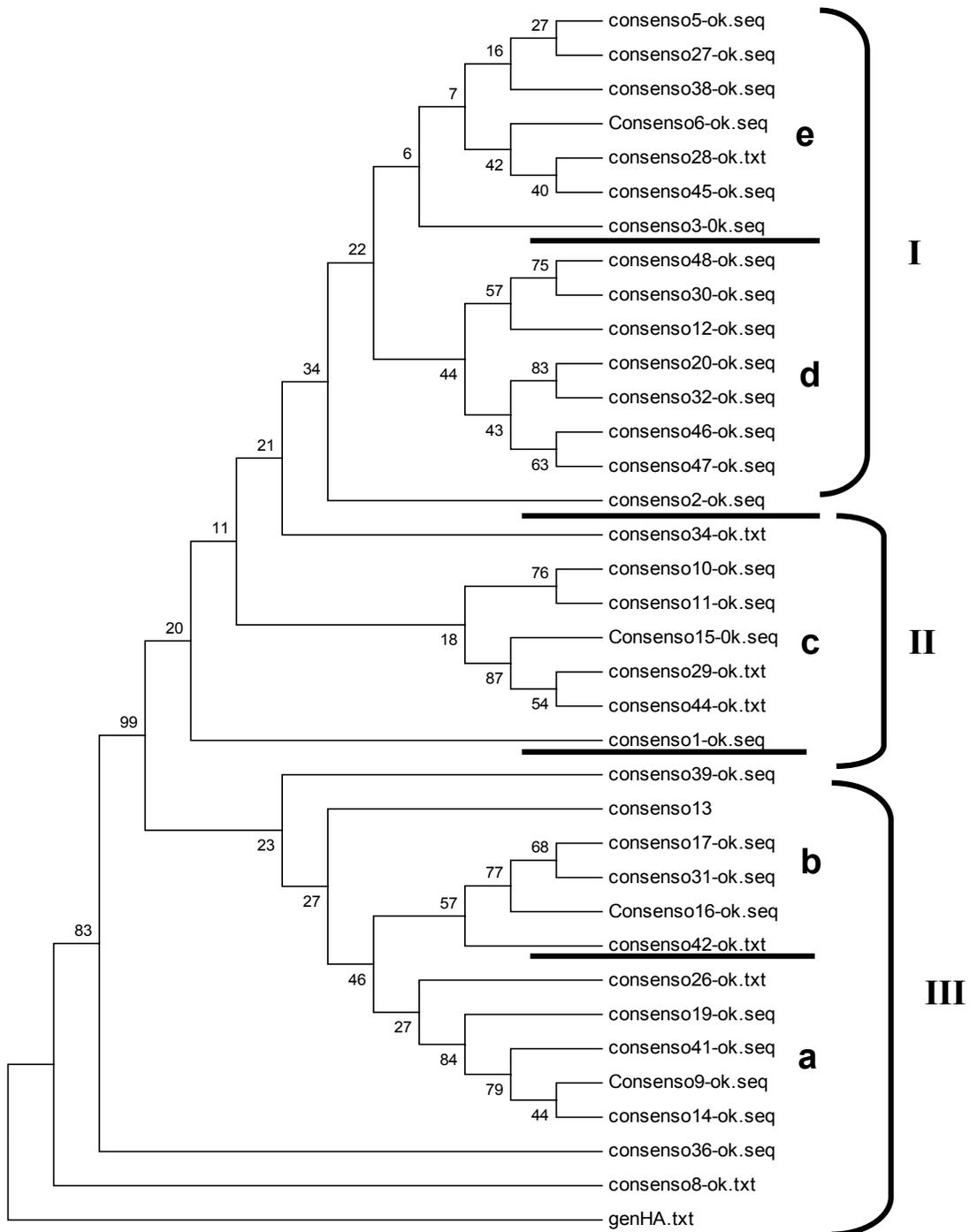


Figura 5. Dendrograma donde se muestran las relaciones genéticas presentes entre 35 cepas del virus de influenza aviar mexicanos aislados en los años 2005 y 2006, y una cepa de referencia (gen HA txt= Hidalgo/28159-232/1994 CY006040).

CUADRO 3. Similitud genética entre las secuencias completas de nucleótidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación a un aislado de referencia (Hidalgo/28159-232/1994 CY006040).

Sequence	Start	End	IGUALES DIFERENTES		
			1	1695	
%IDENTIDAD Hidalgo/28159-232/1994			1	1695	
consenso12-ok.seq	1	1695	1561	134	92
consenso46-ok.seq	1	1695	1561	134	92
consenso47-ok.seq	1	1695	1558	137	91
consenso20-ok.seq	1	1695	1562	133	92
consenso32-ok.seq	1	1695	1557	138	91
consenso27-ok.seq	1	1695	1559	136	91
consenso3-0k.seq	1	1695	1556	139	91
consenso34-ok.txt	1	1695	1561	134	92
consenso10-ok.seq	1	1695	1576	119	92
consenso11-ok.seq	1	1695	1573	122	92
Consenso15-0k.seq	1	1695	1565	130	92
consenso29-ok.txt	1	1695	1564	131	92
consenso44-ok.txt	1	1695	1565	130	92
consenso2-ok.seq	1	1695	1562	133	92
Consenso16-ok.seq	1	1695	1560	135	92
consenso17-ok.seq	1	1695	1562	133	92
consenso31-ok.seq	1	1695	1565	130	92
consenso42-ok.txt	1	1695	1563	132	92
consenso19-ok.seq	1	1695	1570	125	92
consenso14-ok.seq	1	1695	1563	132	92
Consenso9-ok.seq	1	1695	1561	134	92
consenso41-ok.seq	1	1695	1568	127	92
consenso26-ok.txt	1	1695	1566	129	92
consenso8-ok.txt	1	1695	1572	123	92
consenso36-ok.seq	1	1695	1573	122	92
consenso39-ok.seq	1	1695	1570	125	92
consenso13 OK.seq	1	1696	1560	136	91
consenso1-ok.seq	1	1695	1565	130	92
consenso28-ok.txt	1	1695	1557	138	91
consenso45-ok.seq	1	1695	1550	145	91
Consenso6-ok.seq	1	1695	1555	140	91
consenso5-ok.seq	1	1695	1562	133	92
consenso38-ok.seq	1	1695	1560	135	92
consenso48-ok.seq	1	1695	1559	136	91
consenso30-ok.seq	1	1695	1552	143	91

CUADRO 4. Similitud genética entre las secuencias completas de aminoácidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación a un aislado de referencia (Hidalgo/28159-232/1994 CY006040).

Sequence	Start	End	IGUALES	DIFERENTES	%IDENTIDAD
Hidalgo/28159-232/199	1	1695			
consenso12-ok.seq	1	1695	507	58	89
consenso46-ok.seq	1	1695	507	58	89
consenso47-ok.seq	1	1695	506	59	89
consenso20-ok.seq	1	1695	510	55	90
consenso32-ok.seq	1	1695	507	58	89
consenso27-ok.seq	1	1695	510	55	90
consenso3-0k.seq	1	1695	506	59	89
consenso34-ok.txt	1	1695	510	55	90
consenso10-ok.seq	1	1695	514	51	90
consenso11-ok.seq	1	1695	512	53	90
Consenso15-0k.seq	1	1695	512	53	90
consenso29-ok.txt	1	1695	512	53	90
consenso44-ok.txt	1	1695	510	55	90
consenso2-ok.seq	1	1695	510	55	90
Consenso16-ok.seq	1	1695	505	60	89
consenso17-ok.seq	1	1695	506	59	89
consenso31-ok.seq	1	1695	505	60	89
consenso42-ok.txt	1	1695	505	60	89
consenso19-ok.seq	1	1695	514	51	90
consenso14-ok.seq	1	1695	508	57	89
Consenso9-ok.seq	1	1695	506	59	89
consenso41-ok.seq	1	1695	508	57	89
consenso26-ok.txt	1	1695	511	54	90
consenso8-ok.txt	1	1695	517	48	91
consenso36-ok.seq	1	1695	512	53	90
consenso39-ok.seq	1	1695	508	57	89
consenso13 OK.seq	1	1696	505	60	89
consenso1-ok.seq	1	1695	510	55	90
consenso28-ok.txt	1	1695	508	57	89
consenso45-ok.seq	1	1695	507	58	89
Consenso6-ok.seq	1	1695	507	58	89
consenso5-ok.seq	1	1695	509	56	90
consenso38-ok.seq	1	1695	508	57	89
consenso48-ok.seq	1	1695	506	59	89
consenso30-ok.seq	1	1695	499	66	88

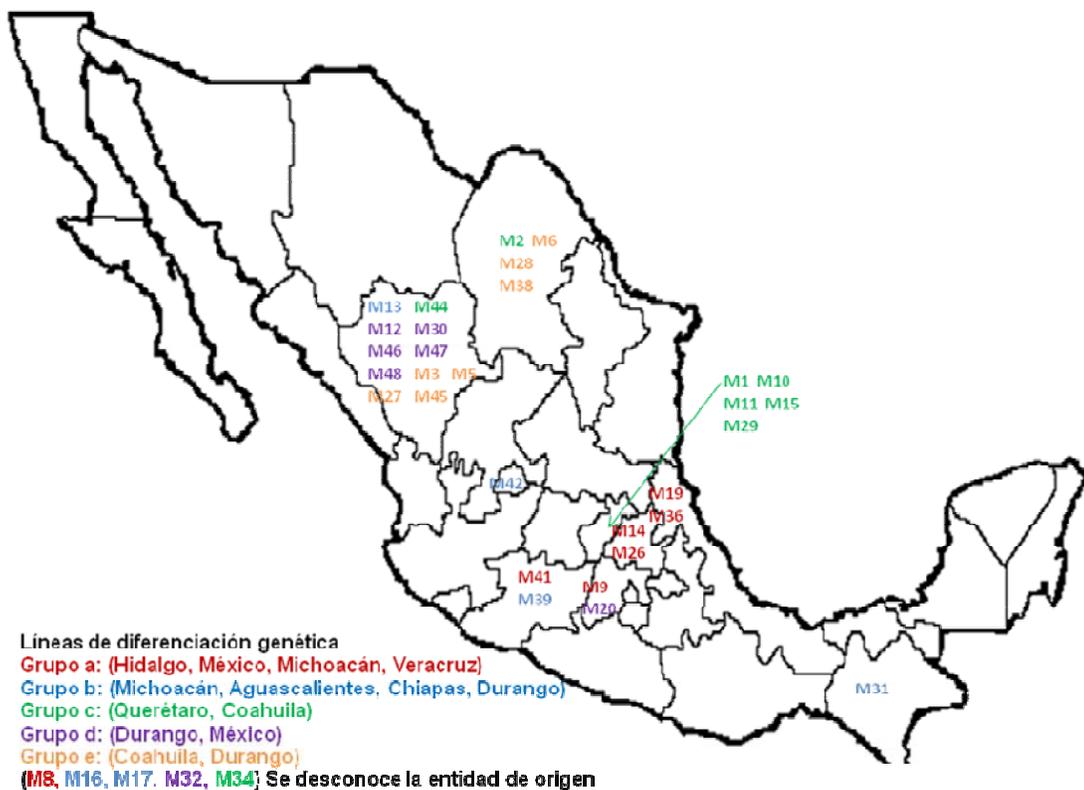
CUADRO 5. Similitud genética entre las secuencias completas de aminoácidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación a la cepa 15.

Sequence	Start	End	IGUALES	DIFERENTES	%IDENTIDAD
Consenso15-0k.seq	1	1695			
consenso2-ok.seq	1	1695	558	7	98
consenso3-0k.seq	1	1695	555	10	98
consenso45-ok.seq	1	1695	555	10	98
consenso28-ok.txt	1	1695	555	10	98
consenso1-ok.seq	1	1695	555	10	98
consenso10-ok.seq	1	1695	556	9	98
consenso11-ok.seq	1	1695	558	7	98
consenso29-ok.txt	1	1695	556	9	98
consenso44-ok.txt	1	1695	563	2	99
Consenso16-ok.seq	1	1695	550	15	97
consenso17-ok.seq	1	1695	546	19	96
consenso31-ok.seq	1	1695	544	21	96
Consenso9-ok.seq	1	1695	547	18	96
consenso14-ok.seq	1	1695	549	16	97
consenso41-ok.seq	1	1695	546	19	96
consenso19-ok.seq	1	1695	548	17	96
consenso26-ok.txt	1	1695	545	20	96
consenso42-ok.txt	1	1695	546	19	96
consenso8-ok.txt	1	1695	532	33	94
consenso36-ok.seq	1	1695	531	34	93
consenso39-ok.seq	1	1695	550	15	97
consenso13 OK.seq	1	1696	549	16	97
consenso48-ok.seq	1	1695	551	14	97
consenso30-ok.seq	1	1695	543	22	96
consenso34-ok.txt	1	1695	553	12	97
consenso46-ok.seq	1	1695	554	11	98
consenso47-ok.seq	1	1695	555	10	98
consenso12-ok.seq	1	1695	556	9	98
consenso20-ok.seq	1	1695	548	17	96
consenso32-ok.seq	1	1695	547	18	96
consenso27-ok.seq	1	1695	553	12	97
consenso38-ok.seq	1	1695	550	15	97
consenso5-ok.seq	1	1695	557	8	98
Consenso6-ok.seq	1	1695	556	9	98

Cuadro 6. Similitud genética entre las secuencias completas de nucleótidos del gen HA (1695 bases) de 35 aislados en comparación al aislado 15.

Sequence	Start	End	IGUALES	DIFERENTES	%IDENTIDAD
Consenso15-0k.seq	1	1695			
consenso2-ok.seq	1	1695	1658	37	97
consenso3-0k.seq	1	1695	1653	42	97
consenso45-ok.seq	1	1695	1649	46	97
consenso28-ok.txt	1	1695	1645	50	97
consenso1-ok.seq	1	1695	1656	39	97
consenso10-ok.seq	1	1695	1659	36	97
consenso11-ok.seq	1	1695	1668	27	98
consenso29-ok.txt	1	1695	1671	24	98
consenso44-ok.txt	1	1695	1681	14	99
Consenso16-ok.seq	1	1695	1632	63	96
consenso17-ok.seq	1	1695	1625	70	95
consenso31-ok.seq	1	1695	1617	78	95
Consenso9-ok.seq	1	1695	1621	74	95
consenso14-ok.seq	1	1695	1623	72	95
consenso41-ok.seq	1	1695	1621	74	95
consenso19-ok.seq	1	1695	1625	70	95
consenso26-ok.txt	1	1695	1619	76	95
consenso42-ok.txt	1	1695	1615	80	95
consenso8-ok.txt	1	1695	1586	109	93
consenso36-ok.seq	1	1695	1585	110	93
consenso39-ok.seq	1	1695	1638	57	96
consenso13 OK.seq	1	1696	1645	51	96
consenso48-ok.seq	1	1695	1644	51	96
consenso30-ok.seq	1	1695	1632	63	96
consenso34-ok.txt	1	1695	1636	59	96
consenso46-ok.seq	1	1695	1646	49	97
consenso47-ok.seq	1	1695	1651	44	97
consenso12-ok.seq	1	1695	1652	43	97
consenso20-ok.seq	1	1695	1636	59	96
consenso32-ok.seq	1	1695	1628	67	96
consenso27-ok.seq	1	1695	1648	47	97
consenso38-ok.seq	1	1695	1636	59	96
consenso5-ok.seq	1	1695	1659	36	97
Consenso6-ok.seq	1	1695	1656	39	97

Al considerar la procedencia de los aislados mexicanos con las líneas de diferenciación genética se observa que el **grupo a**, esta conformado por aislados de las entidades Hidalgo, México, Michoacán y Veracruz, los aislados del **grupo b** proceden de Michoacán, Aguascalientes, Chiapas y Durango, los aislados del **grupo c** provienen de Querétaro y Coahuila, los del **grupo d** proceden de México y Durango y finalmente los del **grupo e** provienen de Coahuila y Durango. Se desconoce la procedencia de 5 aislados. En el Mapa 1 se muestran la ubicación geográfica de los diferentes aislados de IA estudiados identificados con colores dependiendo a su estirpe de diferenciación genética.



Mapa 1. Origen de los diferentes aislados y las diferentes líneas de diferenciación genética de Influenza Aviar 2005-2006

### **VIII.5.- Relaciones genéticas entre los aislados mexicanos actuales y previamente descritos.**

Con secuencias parciales de nucleótidos (996 bases) del gen de HA de los 35 aislados se efectuó un análisis filogenético en donde se incluyen 34 secuencias de aislados mexicanos previamente reportadas (Acceso de GenBank AY497063- AY497191) generando un dendrograma (Figura 6) en donde se grafican las relaciones genéticas entre los diferentes aislados. Se puede apreciar que los aislados del 2005 y 2006 consisten en líneas evolutivas virales totalmente nuevas y alejadas de las poblaciones virales previamente reportadas. En este análisis se conservan y resaltan las 5 líneas de diferenciación genética identificadas.

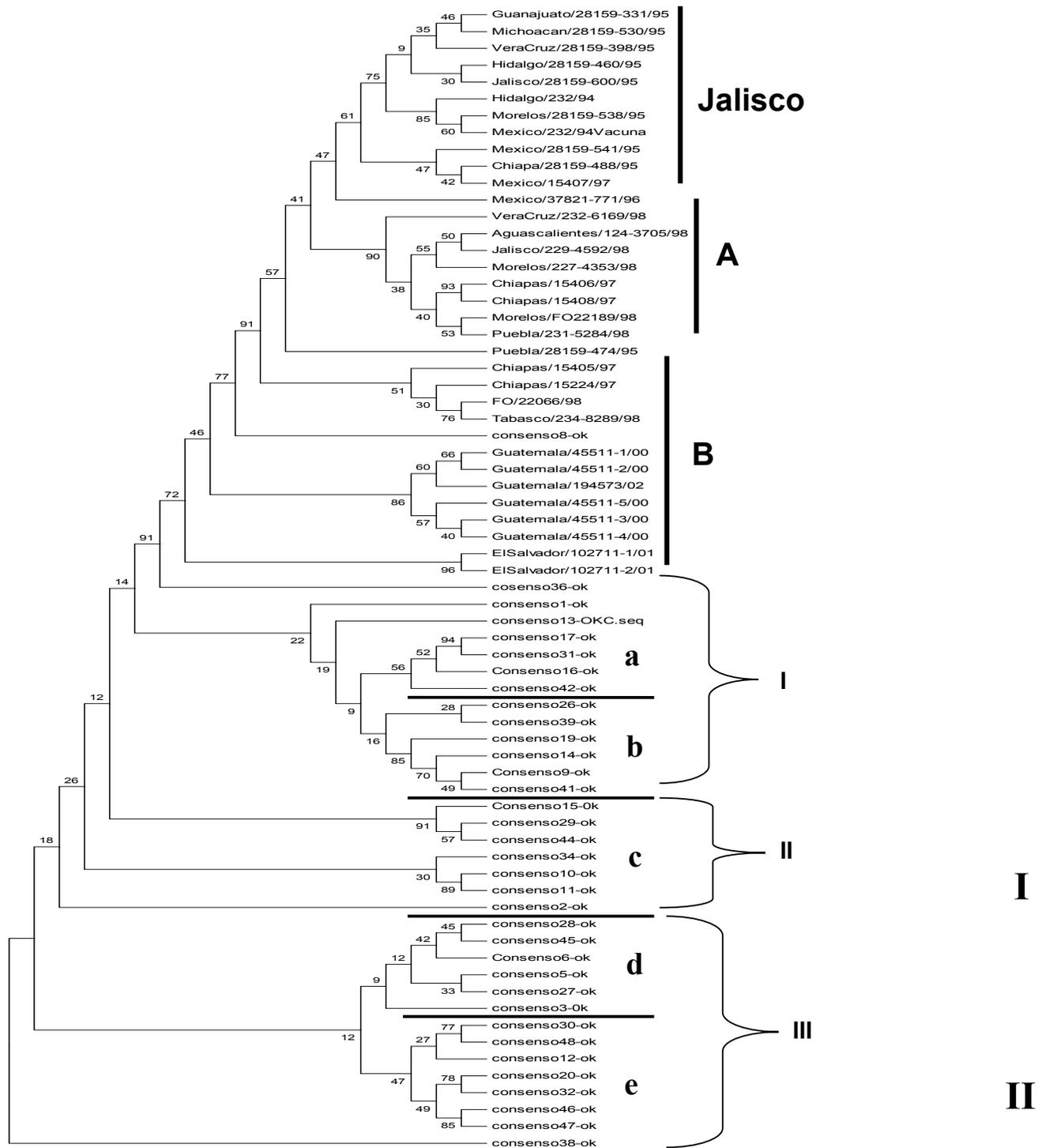


Figura 6. Dendograma donde se muestran las relaciones genéticas presentes entre 35 cepas de virus de influenza aviar mexicanos en los años 2005 y 2006, con aislados previamente descritos entre los años 1994 – 2002

## IX. DISCUSIÓN

A través del uso del RT-PCR se amplificó el gen HA de 36 aislados de IA en nuestro país. Aunque se trabajaron 44 muestras de virus de IA, 8 muestras no amplificaron probablemente porque el título viral era bajo ó por existir contaminantes en las muestras. Debido a que las muestras que no amplificaron fueron procesadas junto a otras que sí lo fueron, pensamos que esta falta de amplificación no fue debida a errores en la metodología empleada. El análisis genético realizado a partir de la secuencia completa del gen HA en 35 aislados virales de influenza aviar en México de los años 2005 y 2006, muestra claramente que estas cepas de IABP han divergido considerablemente de las cepas reportadas anteriormente (1994-2001). En los linajes de virus de IA detectados actualmente, no se identificaron variantes relacionadas a las descritas previamente; esto coincide con los hallazgos reportados por Lee y colaboradores, donde mencionan que los sublinajes de Puebla y Jalisco han desaparecido y han sido desplazados con nuevos sublinajes.<sup>17</sup> Mientras que Lee y colaboradores identificaron dos nuevos linajes en aislados del 2000 – 2001, en los aislados del 2005 – 2006 se encuentran 5 nuevas estirpes que han sustituido a las variantes anteriores.

El análisis molecular muestra 5 líneas de diferenciación genética, sin embargo las relaciones de similitud de aminoácidos muestran que algunas de las líneas de diferenciación tienen semejanzas entre sí, pudiéndose encontrar tres linajes principales de diferenciación.

Si comparamos las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de las cepas mexicanas con un aislado (15) que esta a la mitad de las relaciones genéticas entre todas las cepas, estas difieren entre si entre el 2% y el 7%, con 2 o 34 aminoácidos diferentes y difiriendo entre 14 y 110 nucleótidos (ver cuadros 5y 6). Si consideramos estudios de biología molecular y antigénicos previos en el virus de influenza aviar, han mostrado que diferencias entre cepas en un 5 y 6% a nivel de aminoácidos son suficientes para inducir un cambio de relación antigénica entre ellas desde un 26% hasta un 49%<sup>19</sup>. Esto nos sugiere que puede existir más de un serogrupo en las poblaciones virales estudiadas.

Un hallazgo en el análisis de las secuencias es que 23 aislados están acumulando aminoácidos básicos en la región de corte proteolítico (Anexo 2). Se ha visto que este rasgo es típico de las cepas de alta patogenicidad.<sup>20</sup>

Estos hallazgos indican la existencia de un riesgo latente que los virus de baja patogenicidad pueden mutar a variantes de alta patogenicidad. Chare y colaboradores mencionan que los virus ARN evolucionan rápidamente debido a sus altos niveles de mutación y replicación en grandes poblaciones.<sup>26</sup> Si los virus se encuentran en una amplia población de aves susceptibles o vacunadas con un antígeno con una similitud menor del 95% a los antígenos de éstas nuevas cepas variantes, aumenta la probabilidad de que esto ocurra.  
17

En estudios de protección entre cepas homólogas y heterólogas ha mostrado que porcentajes de homología de secuencia proteínica de la HA menores al 90% entre la cepa vacunal y los virus desafiantes, aunque protege de signos clínicos, no reducen la diseminación del virus en las aves, por lo tanto no evita su transmisión y posible mutación.<sup>16</sup> Sin embargo, cuando la cepa vacunal y las cepas desafiantes guardan una alta relación antigénica, los niveles de diseminación o excreción viral son reducidos notablemente. Por lo anterior, es fundamental que la vacunación no solo sea utilizada para prevenir la enfermedad y muerte, sino también para reducir la diseminación viral empleando un inmunógeno que contenga los determinantes antigénicos de las cepas de campo existentes.<sup>17</sup>

Con base a los resultados obtenidos, un hallazgo notable fue que el tipo de mutaciones que se han presentado en el gen HA de las 35 cepas, han sido mutaciones no neutras, lo que significa que estas mutaciones se han estado seleccionando a favor de que ocurran cambios de aminoácidos; si se considera el porcentaje de similitud genética entre las 35 cepas con respecto a la cepa de referencia de 1994 (91-92%), se puede notar que es menor el número de cambios de nucleótidos con respecto al número de cambios de aminoácidos (89-91%) de las mismas. Lo cual sugiere que estas que estas mutaciones no se están presentando al azar, sino que están siendo dirigidas muy probablemente por la respuesta inmune que desencadena la vacuna.<sup>17</sup>

Al evaluar la procedencia de los aislados mexicanos junto con las líneas de diferenciación genética, se observa que el **grupo a**, conformado por aislados procedentes de Hidalgo, México, Michoacán y Veracruz, ubican este grupo en una región Centro de la República Mexicana, los aislados del **grupo b**, originarios de Michoacán, Aguascalientes, Chiapas y Durango se ubica a lo

largo de la república (sur-norte), los aislados del **grupo c** y **d** provenientes de Querétaro y Coahuila, México y Durango respectivamente, se ubican en una región centro-norte del país, finalmente los del **grupo e** provenientes de Coahuila y Durango se encuentran en la región norte. Esta información sugiere que las líneas de diferenciación genética de los virus de influenza aviar en México se encuentran asociadas preferentemente a ciertas regiones del país. Con la intención de definir la cepa o cepas candidatas a ser evaluadas como inmunógenos para ser usadas como una vacuna actualizada es recomendable efectuar evaluaciones antigénicas de las diferentes estirpes virales. Para esto se propone tomar al menos un aislado de cada una de las 5 líneas de diferenciación e inocular pollos para obtener antisueros y efectuar con ellos experimentos de inhibición de la hemoaglutinación y seroneutralización cruzados. Los datos obtenidos nos informarán del porcentaje de relación antigénica presente entre las diferentes estirpes virales y confirmarían la posibilidad de emplear un menor número de cepas virales como componentes de una vacuna (Muy probablemente tres). Esta información permitirá definir un inmunógeno experimental (una o varias cepas) para ser empleado en ensayos de desafío con varias cepas contemporáneas de las diferentes líneas de diferenciación detectadas, en donde se evaluará el nivel de protección clínico y el grado de protección a nivel de contención de eliminación viral.

## **CONCLUSIONES**

En México se encontró una gran diversidad genética entre los virus de IA 2005-2006 la cual parece estar aumentando con el tiempo. Esta diversidad encontrada en el virus de IA plantea el problema de elegir solo una variante viral como candidata vacunal para emplearse en México. La dificultad principal es que muy probablemente existen cepas circulantes que pueden tener poca relación antigénica entre sí y una sola variante muy seguramente no protegería adecuadamente contra otras cepas antigénicamente diferentes. Por lo anterior, es sumamente importante evaluar las propiedades antigénicas entre las diferentes estirpes genéticas por medio de estudios de inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización cruzada.

La gran diversidad genética que presentan los virus de IA actualmente, lleva a considerar también el cambio antigénico asociado, esto es importante considerarlo en relación a los antígenos de IA que se utilizan de manera rutinaria para el diagnóstico, ya que en el caso de no haber una alta relación antigénica del antígeno empleado con respecto los anticuerpos presentes en el suero de los individuos infectados, se corre el riesgo de encontrar falsos negativos.

Por lo anterior, si se desea tener un diagnóstico eficiente y contener adecuadamente la propagación viral de IA mediante el empleo de una vacuna, es sumamente importante el generar nuevos reactivos diagnósticos, así como vacunas basados en la consideración de la gran diversidad genética del virus de influenza aviar en el país.

Es importante incorporar de forma rutinaria los estudios moleculares basados en secuenciación de nucleótidos y estudios de relaciones antigénicas en los nuevos aislados que estén siendo detectados en el país, con fines de vigilancia epidemiológica.

## **X. LITERATURA CITADA**

- 1.- Swayne DE, Halvorson DA. Influenza. En: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Diseases of Poultry. Iowa: Blackwell Publishing, 2003: 135-160.
- 2.- Villarreal CC, and Rivera CE. An Update on Avian Influenza in México. Avian diseases 2003; 47:1002-1005.
- 3.- Dennis JA. A review of avian influenza in different bird species. Veterinary microbiology 2000; 74: 3-13.
- 4.- Katz JM. The Impact of Avian Influenza Viruses on Public Health. Avian Diseases 2003; 47: 914-920.
- 5.- Harvey R, Martin AC, Zambon M and Barclay W. Restrictions to the Adaptation of Influenza A Virus H5 Hemagglutinin to the Human Host. Journal of Virology 2004; Jan: 502-507.
6. World health organization. [Portal en internet]. [Actualizada 12 Noviembre de 2007, citada en 19 noviembre 2007]. Disponible en: [http://www.searo.who.int/en/Section10/Section1027/Section2095/Section2366\\_13425.asp](http://www.searo.who.int/en/Section10/Section1027/Section2095/Section2366_13425.asp)
- 7.- Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. Veterinary microbiology 2000; 74: 29-46.
- 8.- Shu LL, Lin YP, Wright SM, Shortridge KF and Webster RG. Evidence for Interspecies Transmission and Reassortment of Influenza A Viruses in Pigs in Southern China. Virology 1994; 202: 825-833.
- 9.- Thiry E, Zicola A, Addie D, Egberink H, Hartmann K, Lutz H, Poulet H and Horzinek MC. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. Veterinary microbiology 2007; 122: 25-31.
- 10- Selleck PW, Arzey G, Kirkland PD, Reece RL, Gould AR, Daniels PW and Westbury HA. An outbreak of highly pathogenic

avian influenza in Australia in 1997 caused by an H7N4 virus. Avian Diseases 2003; 47: 806-811.

11.- McLeod A, Morgan N, Prakash A, Hinrichs J, FAO (AGAL and ESCB). Economic and social impacts of Avian Influenza. FAO Emergency Centre for Transboundary Animal Diseases Operations (ECTAD). [portal en internet] [Actualizado 2007, citado 19 de Noviembre 2007]. Disponible en: <http://www.fao.org/avianflu/en/impact.html>

12.- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [portal en Internet]. México: SENASICA [Actualizado 2006; citado 15 Octubre 2007]. Disponible en: [http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud\\_animal/campanas\\_zoosanitarias/Campana\\_Nacional\\_Influenza\\_Aviar.html](http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud_animal/campanas_zoosanitarias/Campana_Nacional_Influenza_Aviar.html).

13.- Halvorson DA, The control of H5 or H7 mildly pathogenic avian influenza: a role for inactivated vaccine. Avian Pathology 2002; 31:5-12.

14.- Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y and Webster RG. Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 influenza Virus in México. Virology 1995; 213: 223-230.

15.- Lamb R and Krug R. Orthomyxoviridae: The viruses and their replications. En: Knipe DM, Howley PM, editors. Fundamental virology. Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 725-762.

16.- Swayne DE, Perdue ML, Beck JR, Garcia M and Suarez DL.. Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. Veterinary microbiology 2000; 74: 165-172.

- 17.- Lee CW, Senne DA and Suarez DL. Effect of Vaccine Use in the Evolution of Mexican Lineage H5N2 Avian Influenza Virus. *Journal of Virology* 2004; Aug: 8372-8281.
- 18.- Horimoto T and Kawaoka Y. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; Jan: 129-149.
- 19.- Pasick J, Handel K, Robinson J, Copps J, Ridd D, Hills K, Kehler H, Cottam-Birt C, Neufeld J, Berhane Y and Czub S. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *Journal of General Virology* 2005; 86: 727-731.
- 20.- Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Veterinary Microbiology* 2000; 74: 77-86
- 21.- Webster R and Rott R. Influenza virus A pathogenicity: The pivotal role of hemagglutinin. *Cell* 1987; 50: 665-666.
- 22.- Stieneke-Gröber A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD and Garten W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO Journal* 1992; 11: 2407-2414.
- 23.- Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti K, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A and Webster G. Characterization of Avian H5N1 Influenza Viruses from Poultry in Hong Kong. *Virology* 1998; 252: 331-342.
- 24.- Suarez DL. Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology* 2000; 74:15-27.

- 25.- Shaw M, Cooper L, Xu X, Thompson W, Drauss S, Guan Y, Zhou N, Klimow A, Cox N, Webster R, Lim, Shortridge K and Sibbarao K.. Molecular Changes Associated With the Transmission of Avian Influenza A H5N1 and H9N2 Viruses to Humans. *Journal of Medical Virology* 2002; 66: 107-114.
- 26.- Chare ER, Gould EA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *Journal of General Virology* 2003; 84: 2691-2703.
- 27.- Kazazian HH. Use of PCR in the Diagnosis of Monogenic Disease. En: Erlic HA, editor. *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton press 1989: 153-169.
- 28- Karp G. DNA Sequencing. En: *Cell and molecular biology*. Editors, Mc Graw-.Hill Book Company, 1984: 854-857
- 29- Hall B. Create a Tree. En: *Phylogenetic Trees Made Easy*. Editors, Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2001: 7-8.
- 30.- Suarez DL, García M, Latimer J, Senne D and Perdue M. Phylogenetic Analysis of H7 Avian Influenza Viruses Isolated from the Live Bird Markets of the Northeast United States. *Journal of Virology*; 1999 May: 3567-3573.
- 31.- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG and Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology* 2001; 146: 2275-2289.
- 32.- Boyle JS and Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* 1995; 11: 8

## Anexo 1. Alineamiento de bases del gen HA de 1695pb de 36 aislados mexicanos del virus de influenza aviar.

```

consenso30-ok.se 1 atgaaaagaacagtgattgaccttgcaataatcagcattgttacaggtgaccaaaatctgcattggttatcatgcaaaaattcaacaaaa
consenso31-ok.se 1 .....t.....a..c
consenso32-ok.se 1 .g.....t.....c.....
consenso34-ok.tx 1 .g.....t.....
consenso36-ok.se 1 .g.....t..a.....c.....a...
consenso38-ok.se 1 .g.....t.....t.....a...
consenso39-ok.se 1 .g.....t.....a..c
consenso41-ok.se 1 .g.....t.....a..c
consenso42-ok.tx 1 .g.....t..a.....a..c
consenso44-ok.tx 1 .....t..a.....a...
consenso45-ok.se 1 .....t.....a...
consenso46-ok.se 1 .g.....t.....
consenso47-ok.se 1 .....t.....
consenso48-ok.se 1 .....g.....a.....
consenso49-ok.tx 1 .g.....t.....c.....a...
consenso1-ok.seq 1 .....t.....
consenso2-ok.seq 1 .....t.....
consenso3-0k.seq 1 .....g.....t.....c.a..c
consenso5-ok.seq 1 .....t.....
Consenso6-ok.seq 1 .....t.....
consenso8-ok.txt 1 .....t.....c.....g.....a...
Consenso9-ok.seq 1 .g.....t.....c.....a...
consenso10-ok.se 1 .....t.....a...
consenso11-ok.se 1 .....t.....a...
consenso12-ok.se 1 .....t.....
consenso13 OK.se 1 .g.....t.....
consenso14-ok.se 1 .g.....t.....c.....a...
Consenso15-0k.se 1 .....t..a.....a...
Consenso16-ok.se 1 .g.....t.....c.....a..c
consenso17-ok.se 1 .g.....t.....c.....a..c
consenso19-ok.se 1 .g.....t.....c.....a...
consenso20-ok.se 1 .g.....t.....c.....a...
consenso26-ok.tx 1 .g.....t.....a...
consenso27-ok.se 1 .....t.....
consenso28-ok.tx 1 .....t.....
consenso29-ok.tx 1 .g.....t..c.....a.....a...

```

```

consenso30-ok.se 91 caagttgacacaatcatggaaaagaatgtgacggtcacacatgccaggacatactggaaaaagaacacaatggagactctgcagttctt
consenso31-ok.se 91 .....a.....a.....a.....a.....
consenso32-ok.se 91 .a.....t.....t.....a.....
consenso34-ok.tx 91 .g.....t.....a.....t.....a.....
consenso36-ok.se 91 .....a.....a.....a.....a.....
consenso38-ok.se 91 .....a.....g.....t.....a.....
consenso39-ok.se 91 .g.....t.....a.....a.....
consenso41-ok.se 91 .....t.....a.....a.....
consenso42-ok.tx 91 .....t.....a.....a.....
consenso44-ok.tx 91 .....a.....a.....aa.....
consenso45-ok.se 91 .....t.....a.....
consenso46-ok.se 91 .....t.....a.....g.....aa.....a
consenso47-ok.se 91 .....t.....a.....g.....ga.....a
consenso48-ok.se 91 .....t.....a.....a.....t.....
consenso49-ok.tx 91 .g.....g.....c.....t.....a.....
consenso1-ok.seq 91 .....a.....a.....a.....
consenso2-ok.seq 91 .....a.....a.....a.....
consenso3-0k.seq 91 .....g.....a.....a.....
consenso5-ok.seq 91 .....g.....a.....a.....a.....
Consenso6-ok.seq 91 .....a.....g.....aa.....a
consenso8-ok.txt 91 .....t.....t.....a.....g.....ga.....a
Consenso9-ok.seq 91 .....t.....a.....a.....
consenso10-ok.se 91 .....a.....a.....t.....
consenso11-ok.se 91 .....a.....a.....t.....
consenso12-ok.se 91 .....t.....a.....a.....
consenso13 OK.se 91 .....a.....g.....a.....
consenso14-ok.se 91 .....g.....a.....a.....
Consenso15-0k.se 91 .....g.....a.....a.....
Consenso16-ok.se 91 .....a.....a.....a.....
consenso17-ok.se 91 .....a.....a.....a.....
consenso19-ok.se 91 .....t.....a.....a.....
consenso20-ok.se 91 .....t.....t.....a.....a.....
consenso26-ok.tx 91 .....t.....a.....a.....
consenso27-ok.se 91 .....a.....t.....a.....
consenso28-ok.tx 91 .....a.....a.....
consenso29-ok.tx 91 .....a.....

```

```

consenso30-ok.se 181 aatggaataaagcccctcattctgaaggattgcagtggtggcttcttggaaatcctatgtgcgatgaattcctgagtggtgccg
consenso31-ok.se 181 .a.....a.....c.....
consenso32-ok.se 181 .....g.....
consenso34-ok.tx 181 .g.....a.....a.....a.....g.....c.....a.....
consenso36-ok.se 181 .a.....c.....a.....a.....a.....a.....g.....t.....c.....a.....
consenso38-ok.se 181 .g.....g.....a.....a.....a.....a.....g.....c.....
consenso39-ok.se 181 .a.....a.....a.....a.....
consenso41-ok.se 181 .....t.....a.....a.....
consenso42-ok.tx 181 .....g.....
consenso44-ok.tx 181 .a.....a.....g.....
consenso45-ok.se 181 .....c.....a.....g.....

```

```

consenso46-ok.se 181 .....g.....
consenso47-ok.se 181 .....g.....
consenso48-ok.se 181 .....g.....
consenso49-ok.tx 181 ..a..g.g.....a..a..a..a..
consenso1-ok.seq 181 .....g.....
consenso2-ok.seq 181 .....g.c.....
consenso3-ok.seq 181 .....g.....
consenso5-ok.seq 181 .....g.....
Consenso6-ok.seq 181 .....g.....
consenso8-ok.txt 181 ..a..g.....t..a.g.a.....e..t..a..a
Consenso9-ok.seq 181 ..a.....t..a.a.a.....g.....
consenso10-ok.se 181 ..a.....g.....
consenso11-ok.se 181 ..a.....g.....
consenso12-ok.se 181 .....g.c.....
consenso13 OK.se 181 ..a..g..g.....t..a..a.....g.....
consenso14-ok.se 181 ..a..g.....t..a..a.....g.....
Consenso15-0k.se 181 ..a.....g.....
Consenso16-ok.se 181 ..a.....g.....
consenso17-ok.se 181 ..a.....g.....
consenso19-ok.se 181 ..a..g.....t..a..a.....
consenso20-ok.se 181 .....g.....
consenso26-ok.tx 181 ..a.....a.....a.....
consenso27-ok.se 181 .....g.....c.....
consenso28-ok.tx 181 .....g.c.....
consenso29-ok.tx 181 ..a.....a.....

```

```

271 gaatggtcatacattgtggagaagacaacccatccaatgacctgtgttacccctggaacttgacaattatggagaactgaagcattta
consenso31-ok.se 271 .....g.....c.....a.....
consenso32-ok.se 271 .....g.....g.....
consenso34-ok.tx 271 .....c.....t.a.....
consenso36-ok.se 271 ..g.....g.....ca.g..t.a..t.....
consenso38-ok.se 271 .....c.....g.....a.....
consenso39-ok.se 271 .....c.....g.....a.....
consenso41-ok.se 271 .....c.....g.....a.....
consenso42-ok.tx 271 .....g.....g.....g.....
consenso44-ok.tx 271 .....g..t.....a.....c.....
consenso45-ok.se 271 .....g.....a.....a.....
consenso46-ok.se 271 .....g.....g.....g.....
consenso47-ok.se 271 .....g.....g.....g.....
consenso48-ok.se 271 .....g.....g.....g.....
consenso49-ok.tx 271 .....a..t.g.g.c.t.g.....ca.g..a.....
consenso1-ok.seq 271 .....a.....a.....
consenso2-ok.seq 271 .....a.....a.....
consenso3-ok.seq 271 .....ag.....a.....
consenso5-ok.seq 271 .....a.....a.....
Consenso6-ok.seq 271 .....a.....a.....
consenso8-ok.txt 271 .....a.....ga.....g..t.c.g..a.....c.....
Consenso9-ok.seq 271 .....g.....c.....g..t.c.g..a.....
consenso10-ok.se 271 .....g.....c.....g.....a.....
consenso11-ok.se 271 .....g.....c.....g.....a.....
consenso12-ok.se 271 .....g.....c.....g.....a.....
consenso13 OK.se 271 .....g.....c.....g.....a.....
consenso14-ok.se 271 .....c.....g.....g.....a.....
Consenso15-0k.se 271 .....g.....c.....g.....a.....c.....
Consenso16-ok.se 271 .....g.....c.....g.....a.....
consenso17-ok.se 271 .....g.....c.....g.....a.....
consenso19-ok.se 271 .....g.....g.....c.....g.....a.....
consenso20-ok.se 271 .....g.....c.....g.....a.....
consenso26-ok.tx 271 .....t..c..a.g.....a.....
consenso27-ok.se 271 .....g.....c.....a.....a.....
consenso28-ok.tx 271 .....g.....c.....a.....a.....
consenso29-ok.tx 271 .....g..t.....a.....c.....

```

```

361 gtgagcagcacaatcattttgagagagttcagatatttctctagaatctttggtccaaccataatgcctcatcaggagtgcagctcagca
consenso31-ok.se 361 a.....c..c.g.....g.....c.....t..c.....
consenso32-ok.se 361 .....c..c.g.....g.....c.....t..c.....
consenso34-ok.tx 361 .....c.....g.....g.g.c.....a.....
consenso36-ok.se 361 a.....a.....g.....g.g.c.....a.....
consenso38-ok.se 361 .....c..c.g.....a..g.....a.....c.....g.....g.....
consenso39-ok.se 361 a.....c..c.g.....a..g.....a.....c.....g.....
consenso41-ok.se 361 .....c..c.g.....a..g.....a.....c.....
consenso42-ok.tx 361 a.....c.....c.....c.....
consenso44-ok.tx 361 .....c.....c.....c.....
consenso45-ok.se 361 .....c.....c.....c.....
consenso46-ok.se 361 .....c.g.....g.....
consenso47-ok.se 361 .....c.g.....g.....
consenso48-ok.se 361 .....c.....c.....
consenso49-ok.tx 361 a.....e.....a.a.....g.g.c.....g.c.....t.....
consenso1-ok.seq 361 .....c.....c.....
consenso2-ok.seq 361 .....c.....c.....
consenso3-ok.seq 361 .....c.....c.....
consenso5-ok.seq 361 .....c.....c.....
Consenso6-ok.seq 361 .....c.....c.....
consenso8-ok.txt 361 a.....g..g.....a..a.....g.g.c.....g.....t.....
consenso9-ok.seq 361 .....c..c.g.....a..g.....a.....c.....a.....c.....
consenso10-ok.se 361 .....c..c.g.....a..g.....a.....c.....g.....
consenso11-ok.se 361 .....c.....c.....c.....
consenso12-ok.se 361 .....c.....c.....c.....
consenso13 OK.se 361 .....t..c.....t..atg.....
consenso14-ok.se 361 .....c..c.g.....a..g.....c..a..c.....
Consenso15-0k.se 361 .....c.....c.....c.....

```





consenso13 OK.se	811	.....c.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....t.....
consenso14-ok.se	811	.....c.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....t.....
Consenso15-0k.se	811	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....t.....
Consenso16-ok.se	811	.....a.....a.....a.....a.....a.....a.....a.....t.....
consenso17-ok.se	811	.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso19-ok.se	811	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....t.....
consenso20-ok.se	811	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....t.....
consenso26-ok.tx	811	.....g.....t.....t.....a.....t.....a.....t.....g.....t.....
consenso27-ok.se	811	.....t.....t.....a.....t.....a.....t.....g.....t.....
consenso28-ok.tx	811	.....a.....t.....g.....g.....g.....g.....g.....t.....
consenso29-ok.tx	811	.....g.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso30-ok.se	901	atgaattccagtttgccctttccacaatgtccatccctttaccattggggagtgccctaggtagtgc aaatcgaagaaactggtccttgca
consenso31-ok.se	901	..t.....c.....c.....t.....a.....c.....a.....a.....a.....t.....
consenso32-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso34-ok.tx	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso36-ok.se	901	..a..c.....g.....t.....a.....a.....c.....g.....a.....t.....
consenso38-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso39-ok.se	901	..a..a.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso41-ok.se	901	..a..a.....a.....a.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso42-ok.tx	901	..a.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso44-ok.tx	901	..a.....g.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso45-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso46-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso47-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso48-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso49-ok.tx	901	..a.....a.....a.....t.....t.....t.....t.....c.....a.....a.....a.....t.....
consenso1-ok.seq	901	..a.....a.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso2-ok.seq	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso3-ok.seq	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso5-ok.seq	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
Consenso6-ok.seq	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso8-ok.txt	901	..c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
Consenso9-ok.seq	901	..a.....c.....a.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso10-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso11-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso12-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso13 OK.se	901	..a.....c.....a.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso14-ok.se	901	..a.....c.....a.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
Consenso15-0k.se	901	..a.....c.....a.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
Consenso16-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso17-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso19-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso20-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso26-ok.tx	901	..a.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso27-ok.se	901	.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....
consenso28-ok.tx	901	..a.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso29-ok.tx	901	..a.....g.....c.....c.....c.....c.....c.....c.....t.....
consenso30-ok.se	991	actggactaaaaaatgtgcctcaaaaagaaa-----caagaggcttatttggagcaatagccggattcatagaaggaggatgg
consenso31-ok.se	991	..a..g.....g.....c.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....
consenso32-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso34-ok.tx	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso36-ok.se	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....g.....g.....g.....
consenso38-ok.se	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....g.....g.....g.....
consenso39-ok.se	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....g.....g.....g.....
consenso41-ok.se	991	..a.....cg.....a.....ca.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso42-ok.tx	991	..a.....c.....gg.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso44-ok.tx	991	..a.....c.....g.....a.....c.....g.....g.....g.....g.....
consenso45-ok.se	991	..a.....c.....g.....a.....c.....g.....g.....g.....g.....
consenso46-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso47-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso48-ok.se	991	..a.....g.....g.....c.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso49-ok.tx	991	..a.....g.....g.....c.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso1-ok.seq	991	..a.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso2-ok.seq	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso3-ok.seq	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso5-ok.seq	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
Consenso6-ok.seq	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso8-ok.txt	991	..a.....c.....g.....a.....c.....cg.....g.....a.....g.....g.....g.....
Consenso9-ok.seq	991	..a.....cg.....a.....ca.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso10-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso11-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso12-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso13 OK.se	991	..a.....cg.....a.....ca.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso14-ok.se	991	..a.....cg.....a.....ca.....g.....a.....g.....g.....g.....
Consenso15-0k.se	991	..a.....c.....g.....a.....c.....g.....g.....g.....g.....
Consenso16-ok.se	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso17-ok.se	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso19-ok.se	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso20-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso26-ok.tx	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso27-ok.se	991	.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso28-ok.tx	991	..a.....g.....g.....a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....
consenso29-ok.tx	991	..a.....c.....g.....a.....g.....g.....g.....g.....g.....g.....
consenso30-ok.se	1069	caaggaatggtggaaggatggtatggataaccaccataacaatgagcagggtagtggatgctgcagacaaagaatctacacagaaagca
consenso31-ok.se	1069	.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso32-ok.se	1069	.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso34-ok.tx	1069	.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso36-ok.se	1069	.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....

```

consenso38-ok.se 1069 .....t.....g.....
consenso39-ok.se 1069 .....t.....g.....
consenso41-ok.se 1069 .....t.....g.....
consenso42-ok.tx 1069 .....a.....t.....g.....
consenso44-ok.tx 1069 .....t.....t.....g.....
consenso45-ok.se 1069 .....t.....c.....g.....
consenso46-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso47-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso48-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso49-ok.tx 1081 .....t.....t.....g.....
consenso1-ok.seq 1069 .....t.....t.....g.....
consenso2-ok.seq 1069 .....t.....t.....g.....
consenso3-0k.seq 1069 .....t.....t.....g.....
consenso5-ok.seq 1069 .....t.....t.....g.....
Consenso6-ok.seq 1069 .....t.....t.....g.....
consenso8-ok.txt 1069 .....g.....t.....t.....g.....
Consenso9-ok.seq 1069 .....t.....t.....g.....
consenso10-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso11-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso12-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso13 OK.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso14-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
Consenso15-0k.se 1069 .....t.....t.....g.....
Consenso16-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso17-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso19-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso20-ok.se 1069 .....t.....t.....g.....
consenso26-ok.tx 1069 .....t.....t.....g.....
consenso27-ok.se 1069 .....t.....g.....t.....g.....
consenso28-ok.tx 1069 .....t.....c.....t.....g.....
consenso29-ok.tx 1069 .....t.....t.....t.....g.....

```

```

consenso30-ok.se 1159 attgatgggatccctaataaagtcaactcaatcattggc AAAATgaacactcaattcgaagccattgggaaagaattcaacaaccagaa
consenso31-ok.se 1159 .....a.....a.....g.....t.....t.....t.....
consenso32-ok.se 1159 .....a.....a.....c.....t.....g.....a.....c.....t.....t.....
consenso34-ok.tx 1159 .....a.....a.....a.....t.....g.....a.....c.....t.....t.....
consenso36-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....t.....g.....c.....g.....t.....t.....
consenso38-ok.se 1159 .....a.....a.....c.....t.....t.....c.....c.....g.....t.....
consenso39-ok.se 1159 .....a.....t.....a.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
consenso41-ok.se 1159 .....a.....t.....a.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
consenso42-ok.tx 1159 .....a.....a.....a.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso44-ok.tx 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....c.....c.....c.....t.....
consenso45-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....c.....c.....c.....t.....
consenso46-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....c.....c.....c.....t.....
consenso47-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....c.....c.....c.....t.....
consenso48-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....c.....c.....c.....t.....
consenso49-ok.tx 1171 .....c.....a.....a.....a.....a.....g.....g.....t.....t.....
consenso1-ok.seq 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso2-ok.seq 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso3-0k.seq 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso5-ok.seq 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....t.....
Consenso6-ok.seq 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso8-ok.txt 1159 .....a.....a.....a.....g.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
Consenso9-ok.seq 1159 .....a.....a.....a.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso10-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
consenso11-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
consenso12-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
consenso13 OK.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
consenso14-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
Consenso15-0k.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
Consenso16-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....g.....g.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso17-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....g.....g.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso19-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....g.....g.....t.....t.....t.....t.....t.....
consenso20-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....c.....t.....t.....
consenso26-ok.tx 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....c.....a.....t.....
consenso27-ok.se 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....c.....c.....g.....t.....
consenso28-ok.tx 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....
consenso29-ok.tx 1159 .....a.....a.....a.....c.....t.....t.....t.....t.....c.....c.....t.....t.....

```

```

consenso30-ok.se 1249 aggagaatagagaatttgaataagaaaatggaagatgttttttggatgatggacttacaatgcatttcttctagtctatggaaaac
consenso31-ok.se 1249 .....g.....a.....gaa.....
consenso32-ok.se 1249 .....a.....a.....gaa.....c.....
consenso34-ok.tx 1249 .....g.....a.....gaa.....
consenso36-ok.se 1249 .....a.....a.....ac.....a.....gaa.....
consenso38-ok.se 1249 .....a.....a.....gaa.....
consenso39-ok.se 1249 .....a.....a.....gaa.....
consenso41-ok.se 1249 .....g.....ac.....a.....gaa.....
consenso42-ok.tx 1249 .....g.....ac.....gaa.....
consenso44-ok.tx 1249 .....a.....gaa.....
consenso45-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso46-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso47-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso48-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso49-ok.tx 1261 .....a.....gc.....a.....gaa.....
consenso1-ok.seq 1249 .....a.....a.....gaa.....
consenso2-ok.seq 1249 .....c.....a.....gaa.....
consenso3-0k.seq 1249 .....a.....gaa.....
consenso5-ok.seq 1249 .....a.....gaa.....
Consenso6-ok.seq 1249 .....a.....gaa.....g.....
consenso8-ok.txt 1249 .....a.....c.....c.....ac.....gaa.....
Consenso9-ok.seq 1249 .....g.....ac.....gaa.....

```

```

consenso10-ok.se 1249 .....ac.....gaa.....
consenso11-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso12-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso13 OK.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso14-ok.se 1249 .....g.ac.....gaa.....
Consenso15-0k.se 1249 .....a.....gaa.....
Consenso16-ok.se 1249 .....g.a.....gaa.....
consenso17-ok.se 1249 .....g.a.....gaa.....
consenso19-ok.se 1249 .....g.a.....gaa.....
consenso20-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso26-ok.tx 1249 .....a.c.....g.ac.....gaa.....
consenso27-ok.se 1249 .....a.....gaa.....
consenso28-ok.tx 1249 .....a.....gaa.....
consenso29-ok.tx 1249 .....a.....ggg.....

```

```

consenso30-ok.se 1339 gagagaactctggatctccatgattcaaatgtcaagaacttatacgaaaaaggctccagctcagctgagaacaatgcaaaaagaattaggg
consenso31-ok.se 1339 .....
consenso32-ok.se 1339 ..g..t.....c.....t.....t.....
consenso34-ok.tx 1339 .....
consenso36-ok.se 1339 .....t.g..t.....g.t.....c.....
consenso38-ok.se 1339 .....c.....t.....a.t.....
consenso39-ok.se 1339 .....t.....t.....
consenso41-ok.se 1339 ..a.....t.....t.....
consenso42-ok.tx 1339 .....
consenso44-ok.tx 1339 .....t.....g.....
consenso45-ok.se 1339 .....c.....t.....
consenso46-ok.se 1339 .....
consenso47-ok.se 1339 .....t.....g.....
consenso48-ok.se 1339 .....t.....g.....
consenso49-ok.tx 1351 ..a.....a.....t.g.....g.....
consenso1-ok.seq 1339 .....c.....t.....t.....
consenso2-ok.seq 1339 .....c.....t.....t.....
consenso3-0k.seq 1339 ..t.....c.....t.....t.....t.....
consenso5-ok.seq 1339 .....c.....t.....t.....t.....
Consenso6-ok.seq 1339 .....c.....t.....t.....t.....
consenso8-ok.txt 1339 ..a.....c.....t.....t.....g.....
Consenso9-ok.seq 1339 ..a.....t.....t.....t.....
consenso10-ok.se 1339 .....t.....t.....g.....
consenso11-ok.se 1339 .....t.....t.....g.....
consenso12-ok.se 1339 .....
consenso13 OK.se 1339 .....t.c.....t.....t.....
consenso14-ok.se 1339 ..a.....t.....t.....t.....g.....
Consenso15-0k.se 1339 .....
Consenso16-ok.se 1339 .....t.....t.....g.....
consenso17-ok.se 1339 .....
consenso19-ok.se 1339 .....
consenso20-ok.se 1339 ..a.....c.....t.....t.....t.....
consenso26-ok.tx 1339 .....
consenso27-ok.se 1339 .....c.....t.....a.t.....t.....
consenso28-ok.tx 1339 .....c.....t.....t.....t.....
consenso29-ok.tx 1339 .....t.....t.....t.....g.....

```

```

consenso30-ok.se 1429 aatggatgctttgaattctaccacaagtgtacaactgaatgtatggaagtgtgagaatggaacgtataattaccacaactcaaaa
consenso31-ok.se 1429 .....
consenso32-ok.se 1429 ..g.....c.....c.....
consenso34-ok.tx 1429 .....
consenso36-ok.se 1429 ..c..t.....g.....c.....g.....
consenso38-ok.se 1429 ..g.....c.....c.....
consenso39-ok.se 1429 ..c.g.....c.....t.....g.....
consenso41-ok.se 1429 .....c.....g.t.....t.g.....
consenso42-ok.tx 1429 .....g.....c.....c.....c.....
consenso44-ok.tx 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....g.....
consenso45-ok.se 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....c.....
consenso46-ok.se 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....c.....
consenso47-ok.se 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....c.....
consenso48-ok.se 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....c.....
consenso49-ok.tx 1441 ..c.g.....g.....c.....g.c..t.....g.....
consenso1-ok.seq 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....c.....
consenso2-ok.seq 1429 .....g.....c.....c.....c.....
consenso3-0k.seq 1429 .....g.....c.....c.....c.....
consenso5-ok.seq 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....c.....
Consenso6-ok.seq 1429 ..c.g.....g.....g.g.t.....c.....c.....g.....
consenso8-ok.txt 1429 ..c.g.....g.....g.g.t.....a.....c.....g.....g.....
Consenso9-ok.seq 1429 .....g.....c.....t.....g.....g.....
consenso10-ok.se 1429 ..c.g.....g.....g.....c.....c.....g.....
consenso11-ok.se 1429 .....c.....c.....c.....c.....
consenso12-ok.se 1429 ..c.g.....c.....c.....c.....c.....
consenso13 OK.se 1429 .....c.....g.t.....g.....
consenso14-ok.se 1429 .....c.g.....t.....c.....g.....
Consenso15-0k.se 1429 ..c.g.....t.....c.....g.....
Consenso16-ok.se 1429 .....
consenso17-ok.se 1429 .....
consenso19-ok.se 1429 .....
consenso20-ok.se 1429 .....g.....c.....c.....c.....
consenso26-ok.tx 1429 .....g.....g.....c.....c.....c.....
consenso27-ok.se 1429 .....g.....c.....c.....c.....c.....
consenso28-ok.tx 1429 ..c.g.....t.....c.....c.....c.....
consenso29-ok.tx 1429 ..c.g.....t.....c.....c.....c.....g.....

```

```

consenso30-ok.se 1519 gaagcaagactgaacagagaggagattgaaggagtcaaattggaatcaacagggacttatcagatactttcaatctattctaccogtagtg
consenso31-ok.se 1519 ..t.....t.....t.....a.....

```

```

consenso32-ok.se 1519 ...t.....a.....a.....a.....
consenso34-ok.tx 1519 ..t.....a.....a.....a.....g.....a.....ac.a.g.c
consenso36-ok.se 1519 .gt..a..a.....a..g.....a.....
consenso38-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....g.....
consenso39-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....g.....
consenso41-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....g.....
consenso42-ok.tx 1519 ..t.....t.....a.....a.....t.....
consenso44-ok.tx 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso45-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso46-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso47-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso48-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso49-ok.tx 1531 ..t.....g..a..c.....a.....tg.....a..a..c
consenso1-ok.seq 1519 ..t.....t.....a.....a.....c.....a.....
consenso2-ok.seq 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso3-ok.seq 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso5-ok.seq 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
Consenso6-ok.seq 1519 ..t.....t.....a.....a.....c.....t.....a.....
consenso8-ok.txt 1519 ..t.....a.....a.....a.....a.....a.....
Consenso9-ok.seq 1519 ..t..a..a.....a.....a.....a.....
consenso10-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso11-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso12-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso13 OK.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso14-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
Consenso15-0k.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
Consenso16-ok.se 1519 ..t.....t.....t.....a.....a.....
consenso17-ok.se 1519 ..t.....t.....t.....a.....a.....
consenso19-ok.se 1519 ..t.....t.....t.....a.....a.....
consenso20-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso26-ok.tx 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso27-ok.se 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso28-ok.tx 1519 ..t.....t.....a.....a.....a.....
consenso29-ok.tx 1519 ..t.....t.....a.....a.....tc.g.....tta..c

consenso30-ok.se 1609 agttccctagcactggcaatcatggtagctctatcttttggatgctccaatgggctcattgcagtcagagaattgcataaa-
consenso31-ok.se 1609 .....a.....t.....c.....
consenso32-ok.se 1609 .....c.c.c.t.....c.....
consenso34-ok.tx 1609 .....c.....c.....c.....
consenso36-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso38-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso39-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso41-ok.se 1609 .....a.....t.....c.....
consenso42-ok.tx 1609 .....a.....t.....a.....c.....
consenso44-ok.tx 1609 .....a.....t.....c.....
consenso45-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso46-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso47-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso48-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso49-ok.tx 1621 .....tg.....a..c.....c.....
consenso1-ok.seq 1609 .....c.....c.....c.....
consenso2-ok.seq 1609 .....c.....c.....c.....
consenso3-ok.seq 1609 .....c.....c.....c.....
consenso5-ok.seq 1609 .....c.....c.....c.....
Consenso6-ok.seq 1609 .....c.....c.....c.....
consenso8-ok.txt 1609 .....t.....a.....c.....
Consenso9-ok.seq 1609 .....a.....t.....t.....c.....
consenso10-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso11-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso12-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso13 OK.se 1609 .....c.....c.....c.....a
consenso14-ok.se 1609 .....a.....c.....c.....
Consenso15-0k.se 1609 .....c.....c.....c.....
Consenso16-ok.se 1609 .....a.....t.....c.....c.....
consenso17-ok.se 1609 .....a.....t.....c.....c.....
consenso19-ok.se 1609 .....t.....c.....c.....
consenso20-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso26-ok.tx 1609 .....a.....t.....c.....c.....
consenso27-ok.se 1609 .....c.....c.....c.....
consenso28-ok.tx 1609 ..t.....c..a..c.....c.....
consenso29-ok.tx 1609 .....c.....c.....c.....

```

consenso49-o	991	tglrnpqrkrkrkrkgifgalagfiegguqgmvdgvyghsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnslidkmtqfeavgkefnrierrienlnkkmedgfidvuty
Consenso15-0	991	.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso2-ok	991	.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso3-ok	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso45-o	991	..k.....ke.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso28-o	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso1-ok	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso10-o	991	.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso11-o	991	.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso29-o	991	.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso44-o	991	.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
Consenso16-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso17-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso31-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
Consenso9-ok	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso14-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso41-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso19-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso26-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso42-o	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso8-ok	991	.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso36-o	991	.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso39-o	991	.....f.....r.....n.....p.....i.....d.l.....
consenso13 0	991	.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso48-o	991	..k.....ke.....e.....n.....p.....i.....d.l.....
consenso30-o	991	..k.....ke.....e.....n.....p.....i.....p.....v.l.....
consenso34-o	991	.....e.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso46-o	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso47-o	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso12-o	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso20-o	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....
consenso32-o	991	..k.....ke.....g.k.....i.....d.l.....
consenso27-o	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....s.....d.l.....
consenso38-o	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....s.....d.l.....
consenso5-ok	991	..k.....ke.....n.....g.....i.....d.l.....

Anexo 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen HA en la región de corte protéolítico. La secuencia 49 corresponde a una cepa de alta patogenicidad aislada en 1994 (amarillo) y se muestra como posee una adición de cuatro aminoácidos básicos. Se aprecia que algunas de las secuencias de los aislados de IA recientes tienen en esa región aminoácidos básicos.