



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“Estudio retrospectivo de la seroprevalencia
contra el virus de la influenza A(H1N1) en
población mexicana de 2007 a 2009”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ADRIANA NÚÑEZ VALENCIA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rodolfo Pastelin Palacios

VOCAL: Profesor: Constantino III Roberto López Macías

SECRETARIO: Profesor: Laura Cecilia Bonifaz Alfonso

1er. SUPLENTE: Profesor: Luz María del Rocío Valdes Gómez

2° SUPLENTE: Profesor: Cristina del Carmen Gil Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA DEL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL
SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA: DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

(NOMBRE Y FIRMA)

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. CRISTINA DEL CARMEN GIL CRUZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE: ADRIANA NÚÑEZ VALENCIA

(nombre (s) y firma (s))

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo y cariño incondicional.

“Nunca sueño cuando duermo, sino cuando estoy despierto”

Milan Kundera

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por haber permitido que me uniera a su grupo de trabajo.

Al Dr. Constantino III Roberto López Macías, por su dirección y consejos en la realización de este trabajo.

A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano, por su consejo instrucción y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Cristina Gil Cruz, por su por su dirección y consejos en la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura Bonifaz y al Dr. Rodolfo Pastelin por su apoyo y sus valiosos consejos en la realización de este trabajo.

A la Dra. Clara Espitia Pinzón y al M. en C. Antonio Valecillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas por las facilidades otorgadas para el uso de sus instalaciones P3.

Al Dr. Bernardo Lozano Dubernard, MVZ Horacio Lara Puente, y al MVZ Francisco Quezada Monroy de AVI-MEX S.A. de C.V. por el préstamo de sus instalaciones y ayuda durante el uso de las cepas virales porcinas.

A la Dra. Celia Alpuche Aranda y al Dr. José Alberto Díaz Quiñones del InDRE, por habernos otorgado el permiso del uso de la cepa viral A/México/4482/2009(H1N1).

Al EBC QFB Julio César Martínez y al Banco Central de Sangre del CMN siglo XXI por su valioso apoyo al proyecto en conjunto.

A mis compañeros de la UIMIQ, especialmente al M en C Ismael Mancilla Herrera, al QFB Pablo Núriban Valero Pacheco, a la QFB Marisol Pérez Toledo y al pQFB Esteban Domínguez Cerezo por su ayuda en los experimentos, consejos y recomendaciones en la escritura de este trabajo.

FINANCIAMIENTOS

Este proyecto fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número 2010-785-002.

Este proyecto fue financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, (proyecto registrado en el Fondo de Investigación en Salud (FIS) del IMSS proyecto número FIS/IMSS/PROT/714.) Y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto número SALUD-2009-CO2-127068.

Agradezco también el apoyo recibido a través del proyecto del FIS/IMSS/PROT/703 cargo del Dr. Constantino López Macías.

ÍNDICE

Contenido

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
.....	4
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
MARCO TEÓRICO	9
La influenza	9
El virus de influenza	9
Estructura y función de la hemaglutinina	11
Respuesta inmune del hospedero	12
Epidemiología	16
Vigilancia epidemiológica	17
Seroprevalencia	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
▪ OBJETIVOS PARTICULARES	21
MODELO EXPERIMENTAL	22
Material y métodos	22
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIÓN	44
REFERENCIAS	45

RESUMEN

En abril de 2009 México fue el epicentro de una nueva epidemia de influenza, originada por el virus pandémico de influenza A(H1N1) 2009.

En este trabajo se evaluó la seroprevalencia de anticuerpos en contra de los virus de influenza pandémico A(H1N1) 2009, y las cepas vacunales porcinas A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) de manera retrospectiva en muestras serológicas de población mexicana desde diciembre de 2007 y hasta noviembre de 2009. Se estudió la capacidad inmunogénica del virus pandémico, y si la exposición previa con virus similares produjo una respuesta cruzada contra este virus. Para esto se realizó la determinación de anticuerpos específicos contra la hemaglutinina (HA) de estos virus, empleando la técnica de la inhibición de la hemoaglutinación (IH). Además se realizó un análisis "*in silico*" entre las cepas utilizadas, para identificar los epitopos compartidos. En él se vio que las cepas H1N1, porcina y pandémica tienen un 97% de similitud, mientras que con la cepa H3N2 presenta una similitud del 43%.

Observamos que la seroprevalencia contra el virus pandémico se incrementa alrededor de siete veces en los sueros tomados después de abril de 2009 en comparación con los sueros tomados antes de esta fecha. Aún así se encontró seroprevalencia desde diciembre de 2007, lo que sugiere que el virus de influenza A pandémico ya se encontraba circulando en la población al menos desde esta fecha, sin embargo, no se presentaba en su forma pandémica hasta 2009. Por otro lado los títulos contra A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) reportaron tanto medias geométricas como seroprevalencias muy altas en todos los periodos, lo que indica que la población estuvo expuesta a estos virus o variantes del mismo con reacción cruzada y que la hemaglutinina del virus pandémico no presenta reactividad cruzada con las cepas circulantes estacionales ni había inmunidad en la población expuesta previamente con otros virus de influenza. También observamos que es probable que en su forma epidémica pueda estar compitiendo con otros virus de influenza en la inducción de inmunidad de grupos.

MARCO TEÓRICO

La influenza

La influenza es una enfermedad estacional infecciosa con síntomas similares a los del resfriado común: escalofríos, fiebre, dolor de garganta, dolor muscular (mialgias), dolor de cabeza (cefalea) severo, tos, sangrado nasal (epistaxis), debilidad (astenia y adinamia) y sensación de adinamia y ataque al estado general cuerpo cortado.¹

La diferencia entre el resfriado común es el agente etiológico. Mientras que para el primero los agentes identificados son rinovirus y adenovirus, el agente etiológico de influenza son los así denominados virus de influenza, los cuales son retrovirus pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae* y se dividen en los tipos A, B y C en función de las diferencias antigénicas de sus proteínas nucleares.²

La influenza humana generalmente es causada por los tipos A y B, que se transmiten mediante aerosoles provenientes de individuos infectados o por el contacto con animales infectados.³

Los virus de la influenza ocasionan en el hombre infecciones respiratorias en forma de epidemias anuales y pandemias ocasionales. Estas últimas son producidas por virus nuevos y afectan a la humanidad en periodos cortos de tiempo. Su importancia se da por su alta transmisibilidad y la rápida capacidad de propagación, su potencial epidémico y pandémico, consecuencias directas de la capacidad de adherencia del virus al epitelio respiratorio y a su eficiente transmisión persona a persona mediante aerosoles.⁴

El virus de influenza

Los viriones de influenza pueden adquirir tanto formas esféricas como filamentosas, con un tamaño aproximado de 100nm en diámetro y 300nm de largo. En su superficie se proyectan espículas HA y NA en una proporción de 4 a 1 así como canales de iones M2 en menor proporción. La envoltura viral y sus tres proteínas de membrana descansan sobre una proteína de matriz M1, que encierra el núcleo del virión, dentro de la cual se encuentran la proteína de exportación nuclear NEP o NS2 y el complejo RNP (ribonucleoproteína) que consiste de segmentos de RNA viral cubiertos con nucleoproteína NP y la RNA

polimerasa, un heterotrímero compuesto por dos polimerasas básicas (PB1, PB2) y una polimerasa ácida (PA).⁵

Estructuralmente cada virus de influenza tiene un genoma que consiste de ocho segmentos de RNA negativos, que codifican para 11 proteínas, de los cuales las proteínas para los que codifican y sus funciones se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Proteínas codificadas por cada uno de los segmentos que componen el genoma viral del virus de influenza A. (Modificado de Bouvier 2008)

Segmento	Tamaño del segmento en nucleótidos	Proteínas codificadas	Tamaño de las proteínas en aminoácidos	Función
1	2341	PB2	759	Subunidad de la polimerasa; reconocimiento del cap de mRNA
2	2341	PB1	757	Subunidad de la polimerasa; elongación del RNA, actividad de endonucleasa.
		PB1-F2	87	Actividad pro-apoptótica
3	2233	PA	716	Subunidad de la polimerasa; proteasa
4	1778	HA	550	Glicoproteína de superficie; antígeno dominante, unión al receptor y fusión.
5	1565	NP	498	Proteína de unión al RNA; regulación del tráfico nuclear
6	1413	NA	454	Glicoproteína de superficie; sialidasa, liberación del virión.
7	1027	M1	252	Proteína de matriz; Regulación de la exportación de RNA nuclear.
		M2	97	Canal iónico; ensamblaje del virión.
8	890	NS1	230	Proteína agonista del interferón; regulación de la expresión génica del hospedero
		NEP/NS2	121	Exportación nuclear de RNA

Aunque los virus de influenza tienen un ancestro en común, la divergencia a través del tiempo ha sido tal que el recambio genético solo puede llevarse a cabo entre miembros del mismo tipo (es decir A con A, B con B ó C con C).⁵

Los virus de influenza A se han clasificado en subtipos en función de las glicoproteínas membranales, la hemaglutinina (HA) y la neuromaminidasa (NA) que son a su vez sus antígenos inmunodominantes y el principal componente

de las vacunas que se comercializan en la actualidad. Hoy en día se conocen 16 subtipos de HA y 9 de NA, los cuales se encuentran en su totalidad circulando en las aves acuáticas, que son su reservorio natural y no presentan sintomatología.

El virus de influenza A tiene dos mecanismos de mutación que son responsables de su alta tasa de cambio. El primero conocido como “drift” o deriva, consiste en mutaciones puntuales que van cambiando la estructura antigénica del virus a largo plazo y en general es responsable del surgimiento de las cepas estacionales anualmente. El segundo se conoce como “shift” o recambio y consiste en la recombinación génica de los segmentos virales entre virus de influenza, lo que provoca en la mayoría de los casos un cambio en la estructura antigénica del virus que le permite escapar al reconocimiento por anticuerpos de memoria.⁶

Existe un sistema estandarizado para nombrar a los virus de influenza, en éste se incluye en este orden: el tipo de virus, el hospedero en caso de que no sea humano, el área geográfica en donde se aisló ese virus, el número de cepa y el año de aislamiento, así como el subtipo (en caso de que se trate de un virus de influenza A) especificando el tipo de HA y NA del que se trata entre paréntesis. Ejemplo: Virus de influenza A, aislado en México de un paciente humano en el año 2009, subtipo H1N1, corresponderá a la cepa del virus de influenza: A/Mexico/4482/2009(H1N1).

Estructura y función de la hemaglutinina

Las propiedades antigénicas del virus de influenza son determinadas por las glicoproteínas membranales hemaglutinina y neuroaminidasa, las cuales como en muchos de los retrovirus tienen una estructura muy variable.

La HA es un trímero de aproximadamente 135Å de largo y con un radio que varía de 15 a 40Å a lo largo de su estructura.

Cada monómero de la HA consiste en dos glicopéptidos unidos mediante un enlace disulfuro; HA1 y HA2. Para unirse se expresa en trímeros, su función es unir y fusionar al virus en la membrana de las células. Y aunque es sintetizada

como un solo péptido es cortada en HA1 y HA2 mediante una proteasa específica del hospedero.

Los aminoácidos en el sitio de corte son importantes para determinar la virulencia del virus. La cual será mayor si estos aminoácidos son lipofílicos.⁷

La hemaglutinina de los virus de influenza reconocen el ácido N-acetilneuroamínico (siálico) en la superficie celular del hospedero, éste es un monosacárido de nueve carbonos que es comúnmente encontrado en glicoconjugados por lo cual está ampliamente distribuido en diversos tipos celulares y especies animales. Sin embargo dependiendo de si su carbono 2 terminal del ácido siálico se encuentra unido al carbono 3 o al carbono 6 de la galactosa, de los azúcares que glicosilan las proteínas. La estructura estérica del ácido siálico se une preferentemente a unas HAs que a otras.⁸

Respuesta inmune del hospedero

Para recuperarse de influenza o prevenir la influenza se requiere de la respuesta innata y la adaptativa en la mucosa respiratoria.

Los factores inhibitorios en la mucosa del tracto respiratorio, que son similares o idénticos a los receptores de ácido siálico, intervienen en la infección de las células del epitelio pulmonar. También se ha observado que los niveles nasales y pulmonares de IFN tipo 1 aumentan rápidamente después de la infección y correlacionan directamente con el grado de replicación viral.²

La mayoría de los virus de influenza son detectados y destruidos en unas pocas horas por los mecanismos de la respuesta inmune innata.² Por ejemplo las células NK detectadas en los pulmones 48h después de la infección por influenza producen IFN-gamma y limitan la dispersión viral mediante lisis de las células infectadas, en la cual probablemente se ve involucrada la perforina.²

El reconocimiento del virus de influenza en las fases iniciales de la infección está dado por los componentes de la inmunidad innata, principalmente por receptores tipo Toll (TLRs) de los cuales los 3, 7 y 8 son los más importantes durante el reconocimiento del virus. TLR3 reconoce RNA de doble cadena, los cuales pueden formarse en algún momento durante el ciclo replicativo del virus en el interior de la célula, mientras que los 7 y 8 reconocen RNA de cadena sencilla.⁹ También el virus puede ser reconocido por receptores como el gene

inducible por retinoides-1 (RIG-1) que son capaces de reconocer RNA viral y activar vías de respuesta antiviral que involucran la producción de interferones tipo I (IFN- α/β) y citocinas pro-inflamatorias¹⁰.

En humanos, el virus de la influenza induce una respuesta de citocinas caracterizada por niveles elevados de IFN- α/β , interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP1- α,β), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y la quimiocina CCL5 o RANTES¹¹.

Se ha reportado que los pacientes con carga viral alta en los pulmones generan una respuesta de citocinas elevada; no obstante, estos pacientes generalmente se recuperan, mientras que, los pacientes que presentan carga viral detectable también en sangre periférica, producen aun más citocinas como IP-10, MCP-1, IL-8, IL-6 e interleucina-10 (IL-10), evolucionan desfavorablemente e incluso fallecen. Lo anterior sugiere que los mediadores de la respuesta inmunitaria durante la infección del virus de influenza puede ser crucial tanto en la protección contra el virus como en los efectos patológicos de la infección¹²

Se ha visto que el complemento participa en la protección, pues la mortalidad aumenta en los ratones deficientes de C5 infectados con una dosis letal de influenza, en comparación con los no deficientes.¹³

Th1 secreta IFN-gamma e IL-2, que promueven la formación de la inmunoglobulina IgG2a, la cual se ha visto tiene un papel primordial en la erradicación de la infección en ratones. La IL-2 también promueve la proliferación de linfocitos Tcitotóxicos (Tc).²

Los virus de influenza promueven la producción de anticuerpos específicos que principalmente reconocen a sus determinantes antigénicos inmunodominantes HA y NA. Esta respuesta de anticuerpos es de gran importancia en la protección contra la reinfección por el virus de influenza A¹⁴.

Las células presentadoras de antígeno (CPAs) son esenciales en la inducción de la respuesta inmune adaptativa¹⁵, ya que median la presentación de antígeno y secretan IL-12 que contribuye al desarrollo de los linfocitos T cooperadores (Th) e IL-1beta.

Los anticuerpos IgG específicos pueden acceder a la mucosa superficial mediante difusión pasiva desde el suero. Y se les encuentra preferentemente en el epitelio alveolar en el plasma. Estos anticuerpos IgG en el suero de ratones inmunizados parecen ser importantes para prevenir la neumonía letal de influenza¹⁶.

En humanos, los anticuerpos contra el virus de influenza A se pueden observar tanto en suero como en las secreciones respiratorias de 3 a 5 días después de la infección primaria. Estos anticuerpos pueden ser producidos sistémicamente en el suero debido a una rápida respuesta a la infección por virus de influenza mediante las células plasmáticas, cuya presencia se evidenciaría a partir de los días 4 y 5 después de la infección.

También, los anticuerpos pueden ser producidos localmente cuando el virus es reconocido por los linfocitos B o las células dendríticas de la submucosa de las vías aéreas. En este caso, las células plasmáticas son detectables en tejido asociado a tracto respiratorio de 5-7 días después de la infección y alcanzan su pico entre los días 10 y 20.¹⁴

Durante la respuesta primaria predominan las células plasmáticas secretoras de IgA e IgM. Esto último sobre todo en tejido linfoide organizado como el nasofaríngeo. La cinética de la respuesta de anticuerpos es consistente con su participación en el control de la infección en el hospedero inmunocompetente.

Los anticuerpos tienen un papel crucial en la protección del hospedero inmunocompetente, ésta protección se atribuye principalmente a los anticuerpos específicos para la hemaglutinina (HA). La inmunidad mediada por anticuerpos específicos para la neuroaminidasa (NA) es más débil, y aunque no previenen la infección, pueden suprimir la replicación y por lo tanto reducir la morbilidad y la mortalidad.

Se ha visto que la inmunogenicidad inducida mediante la HA incrementa la resistencia del hospedero a la influenza y reduce la severidad de la infección.¹⁷

La respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos, una vez que ha generado células B de memoria específicas, tiende a ser de larga duración.

El control de la infección por medio de los anticuerpos puede ser de dos tipos:

1. Impidiendo diseminación del virus infectando a otras células del hospedero.

2. Impidiendo la maduración y la liberación de nuevos viriones a partir de las células infectadas.

Los anticuerpos que actúan de la primera forma se conocen como neutralizantes, pues tienen la capacidad de neutralizar al virus (NV), mientras que los que permiten el segundo mecanismo de acción se conocen como reductores de la liberación (RL).

La actividad NV es mediada por anticuerpos específicos para HA que previenen la unión a la célula hospedera o la fusión intraendosomal.

Los anticuerpos antiHA neutralizan la infección al bloquear su unión con los receptores de ácido siálico de la superficie celular.

Algunos de ellos cubren la región de unión al receptor de ácido siálico directamente, mientras que otros evitan la unión a la célula hospedera mediante un impedimento estérico.¹⁸

Los anticuerpos NV que se unen a determinantes antigénicos alrededor del sitio de unión de la HA. Reconocen regiones en la cabeza de HA, las cuales usualmente se conocen como los sitios A, B, y D, para el subtipo H3 y Sa, Sb y Cb para el subtipo H1. Esta actividad suele medirse mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI).⁵

Los anticuerpos que se unen a zonas proximales a el sitio de unión al ácido siálico muchas veces muestran muy poca o ninguna actividad en las pruebas de HI, normalmente esto sucede con los anticuerpos que reconocen a los sitios C ó E de la HA o Ca1 y Ca2 para los subtipos H3 y H1 respectivamente. Sin embargo estos anticuerpos pueden mostrar aún así capacidad neutralizante, al inhibir la fusión intraendosomal.⁷

Por otro lado los anticuerpos que muestran actividad RL, ejercen su función durante el proceso del ensamblaje del virus en la membrana plasmática. Las proteínas virales transmembranales se acumulan en parches, de donde han

sido desplazadas las proteínas transmembranales endógenas, y se van formando los viriones. El reconocimiento de estas proteínas por anticuerpos específicos produce una reducción en la liberación de los viriones.¹⁴

Epidemiología

El virus de influenza A ha sido el agente causal de algunas de las peores pandemias en la historia de la humanidad. Las pandemias ocurren cuando surge una cepa viral mutante que no es reconocida por los anticuerpos generados por exposiciones anteriores al virus de influenza, y entonces la población en general es susceptible a la infección por esta nueva cepa, o cuando una cepa viral que era específica para un hospedero animal desarrolla la capacidad de infectar a humanos, y de contagiarse.¹⁹

Las pandemias debidas al virus de influenza A subtipo H1N1 ya se han visto a lo largo de la historia de la humanidad. Probablemente la más famosa de ellas es la pandemia de 1918-1919, en la cual se estima que aproximadamente un tercio de la población mundial fue infectada por el virus (500 millones de personas) y de las que fallecieron alrededor de 50 millones. Esta pandemia tuvo una tasa de mortalidad del 2.5%, lo cual resulta muy alto si tomamos en cuenta que para otras pandemias la tasa es del 0.1%²⁰ Durante el transcurso de esta pandemia, se experimentaron tres picos, el primero durante la primavera (en Marzo) y aunque hubo muchos casos, las tasas de mortalidad se mantuvieron relativamente cercanas a las de la influenza estacional (1%), a diferencia del segundo pico que se extendió globalmente entre Septiembre y Noviembre de 1918 y fue altamente letal, registrando una tasa de 2.5%, y finalmente un tercer pico, más atenuado se experimento en algunos países a principios de 1919.

Actualmente pese a los esfuerzos globales de vigilancia epidemiológica las cepas de influenza pandémica seguirán surgiendo y debemos estar listos para responder a esas emergencias.

Incluso hoy en día se estima que la influenza estacional provoca entre 3 y 5 millones de casos severos y entre 250000 y 500000 muertes cada año alrededor del mundo²¹.

Vigilancia epidemiológica

Dada la alta morbilidad y mortalidad generada por los virus de influenza se realizan esfuerzos constantes que en el campo de la vigilancia epidemiológica. Para lo cual se cuenta a nivel mundial con la Red de Vigilancia Global de Influenza o GISN por sus siglas en inglés, un organismo dependiente de la Organización Mundial de la Salud que se encarga de proveer la información sobre las cepas circulantes para poder seleccionar anualmente a las cepas vacunales.²¹

Para esto la GISN cuenta con los Centros Nacionales de Influenza o NICs por sus siglas en inglés, los cuales se encargan de coleccionar muestras de pacientes con enfermedades parecidas a la influenza, les realizan análisis serológicos y mandan un aislamiento representativo del virus a los Centros de Colaboración de la OMS (CC OMS) en donde se les realizarán análisis antigénicos y genéticos.

Anualmente los NICs coleccionan más de 175 000 muestras de pacientes y mandan alrededor de 2000 virus a los CC OMS. Estos últimos proveen a todos los NICs con sueros policlonales, anticuerpos monoclonales, y antígenos virales de cepas relevantes de influenza como reactivos, para asegurar la estandarización de los análisis.

Seroprevalencia

La seroprevalencia es uno de los indicadores que se usan para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica. Se refiere a la proporción de individuos de una población que cumplen con la característica de tener anticuerpos específicos contra un antígeno determinado en un momento o período de tiempo específico.²²

En el caso de la influenza, se miden los títulos de anticuerpos que tienen los individuos de una población contra las diferentes cepas virales de influenza, de forma que podemos conocer cuales virus se encuentran circulando, monitorear el surgimiento de nuevas cepas y el desarrollo de cepas resistentes a los antivirales.

Por otro lado en el contexto de una epidemia, la determinación de la seroprevalencia contra la cepa viral pandémica nos ayuda a determinar la tasa de transmisibilidad y a evaluar la respuesta inmune de la población expuesta mediante la cuantificación de anticuerpos específicos en muestras serológicas, esto a su vez nos da mejores herramientas para la toma de decisiones que ayuden a contener la transmisión y a proteger a la sociedad.

Se ha visto con anterioridad que la seroprevalencia es significativa en una población cuando se alcanza en un 30 al 60% de la misma. En humanos se han tomado como positivos los sueros con títulos de entre 1:32 y 1:40.^{23, 24}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En 2009 México fue el epicentro de una epidemia de influenza cuyo agente etiológico es un nuevo virus de influenza A subtipo H1N1. Dicha epidemia ha causado en nuestro país hasta el 11 de enero de 2010 69,071 casos y 896 defunciones. Actualmente no se conoce el momento en el que empezó a circular este virus entre la población del Distrito Federal, y si esta cuenta con inmunidad debido a la reacción cruzada entre las determinantes antigénicas del nuevo virus y alguna otra cepa de virus de influenza A que se encontraba circulando con anterioridad. Por lo que en éste trabajo se analizará retrospectivamente la exposición al nuevo virus de manera indirecta, al determinar anticuerpos específicos contra la cepa A/Mexico/4482/2009(H1N1) de virus pandémico, y de igual forma se buscarán anticuerpos contra las cepas vacunales porcinas A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) que son similares al virus pandémico.

JUSTIFICACIÓN

El virus de influenza humana A (H1N1) 2009 ha producido la primera pandemia de influenza del siglo XXI. Este nuevo virus pandémico proviene de la adaptación de un virus triple recombinante porcino al hospedero humano por lo que podría existir respuesta cruzada en la población previamente expuesta a las cepas vacunales porcinas.

A partir de las pandemias pasadas se conoce que este tipo de enfermedades presentan incrementos abruptos de morbilidad y mortalidad de forma estacional que duran unas semanas y luego ceden para reaparecer meses después, en un lapso de uno a tres años. Debido a lo anterior, es importante conocer el estado de inmunidad en población antes y después del inicio de la pandemia actual y conocer si la población con exposición previa a virus estacionales o vacunas presenta reactividad cruzada y/o inmunidad contra el virus pandémico. Estos datos son de suma relevancia para la toma de decisiones en materia de salud pública como es el caso de la identificación de grupos de riesgo, la implementación de campañas de vacunación, distanciamiento social y vigilancia epidemiológica.

HIPÓTESIS

La población de estudio no presentará títulos de anticuerpos contra el virus pandémico antes del primer trimestre de 2009 y por tanto no contará con inmunidad. El virus pandémico es altamente inmunogénico e inducirá altos títulos de anticuerpos en la población a partir del segundo trimestre del año 2009 generando inmunidad de grupo. Las personas con previa exposición a virus estacionales o vacunados derivados de virus porcinos presentarán anticuerpos de reactividad cruzada e inmunidad parcial contra el virus pandémico ya que este tiene un origen porcino.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar la seroprevalencia de anticuerpos contra el virus de influenza humana A/México/4482/2009 (H1N1), A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2). en sueros previos y posteriores a la pandemia en personas no enfermas de influenza que acudieron por diversas razones al CMN SXXI.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar las características antigénicas de la hemaglutinina del virus de influenza pandémico 2009 A(H1N1) contra las cepas vacunales humanas y porcinas.
- Comparar mediante un análisis "*in silico*" el uso de la cepa A/México/4482/2009 aislada por el InDRE con la cepa A/California/04/2009(H1N1) para determinar las posibles diferencias de nuestros datos con los obtenidos por otros grupos en el extranjero en donde utilizan la cepa A/California/04/2009(H1N1) y así poder comparar nuestros resultados de los ensayos de inhibición de la hemoaglutinación.
- Determinar retrospectivamente la seroprevalencia contra el virus de influenza A pandémico en una muestra de la población del Distrito Federal, a mediante un ensayo de inhibición de la hemoaglutinación.
- Determinar si la exposición previa con virus estacionales o vacunales similares al virus pandémico, como es el caso de las cepas porcinas A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2), genera una respuesta de anticuerpos e inmunidad cruzada contra el virus pandémico cepa A/México/4482/2009(H1N1).

MODELO EXPERIMENTAL.

Material y métodos.

Diseño de estudio

Se realizó un estudio con sueros obtenidos del banco central de sangre de CMN siglo XXI y de sujetos asintomáticos para infecciones respiratorias, cuya muestra fue tomada como parte del procedimiento de rutina en el Hospital de Pediatría del mismo centro. A estos se les realizó un ensayo de inhibición de la hemoaglutinación con tres virus de influenza A; dos correspondientes a las cepas vacunales porcinas y el otro a la cepa pandémica.

Universo de estudio

Sujetos que acudieron a donar sangre a Centro Médico Nacional siglo XXI y cuyo suero se mantuvo en el banco de sangre del mismo centro, o sujetos que acuden al Hospital de Pediatría y de los que se obtiene una toma de sangre como parte de los análisis de rutina.

Sujetos de estudio

Los sujetos seleccionados para el presente estudio se distribuyeron en grupos en función de la fecha de toma de muestra, las edades de los sujetos y el sexo.

Los criterios de selección de muestra

Criterios de inclusión: Todas las edades, cualquier sexo sin sospecha clínica de infección respiratoria.

Criterios de exclusión: Sospecha o confirmación de enfermedad respiratoria ya sea influenza u otra.

Tamaño de muestra

El estudio se realizó con 317 sueros obtenidos de banco de sangre, y del Hospital de Pediatría, ambos de centro Médico Nacional siglo XXI. Los sujetos de los cuales se obtuvieron los sueros tienen un rango de edad desde 0.25 y hasta 64 años, y las fechas de toma de muestra van desde diciembre del 2007 y hasta noviembre del 2009.

Descripción de variables

Variables de control

- a) Ausencia de síntomas de resfriado indicadores de infección previa o en curso.

Se trata de una variable cualitativa nominal que se expresa como positivo o negativo. Se consideró como positiva cuando el sujeto se describió como asintomático.

Variables de estudio

- a) Título de anticuerpos contra las cepas de virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1), A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) y A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1).

Variable cuantitativa nominal que se expresa como el título determinado mediante ensayo de inhibición de la hemoaglutinación.

Variables demográficas

- a) Fecha de toma de muestra. Variable cuantitativa nominal que se expresa en días/mes/año calendario.

Consideraciones éticas.

El presente estudio se apega a los estándares éticos internacionales establecidos en Helsinki y modificados en Tokio ²⁵ y se desarrolló siguiendo los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas ²⁶.

Los datos que resultaron contaron con la garantía de confidencialidad y buen uso de los mismos, la fuente del análisis y de la información se obtuvo como parte del proceso de atención habitual.

Obtención y procesamiento de las muestras

Se obtuvieron muestras serológicas a partir de las fuentes anteriormente citadas, de las cuales se alicuotaron 200µL en tubos eppendorff de 1.5mL, y se mantuvieron almacenadas a una temperatura de 4°C.

El manejo de estas muestras biológicas se realizó de acuerdo a lo descrito en el Manual de Bioseguridad de la UIMIQ, para lo cual, se cuenta con un área con nivel de bioseguridad 2 plus.

Propagación y crecimiento del virus de influenza A/México/4482/2009 en embriones de pollo. Obtención del cultivo semilla.

Para evitar el cambio antigénico inducido por la siembra consecutiva del virus, se procedió a realizar un cultivo semilla del virus. Para esto, se emplearon embriones de pollo grado SPF (*Specific Pathogen Free*, Libres de Patógenos Específicos) de 4 días de incubación. Primero, se realizó una ovoscopía para establecer el sitio de inoculación del virus. Posteriormente se desinfectó el sitio de inoculación con solución de yodo-povidona al 10% y se perforó el cascarón empleando una aguja calibre 18G. Los embriones se inocularon con 100 μ L ó 200 μ L de suspensión viral inicial. Los embriones inoculados se incubaron a 37 °C durante 72 horas. Al término de este tiempo, los huevos se refrigeraron durante 4 horas y se procedió a la cosecha del virus. Para esto, se retiró la parte apical de cada uno de los huevos con una tijera y se retiró el líquido alantoides. Todo el líquido se colectó en un tubo estéril de 50 mL. Por centrifugación, se separaron las células remanentes provenientes del embrión, y el volumen final de líquido alantoides se repartió en alícuotas en tubos para criopreservación. Todo el procedimiento se realizó en una habitación con nivel de bioseguridad 3 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM..

Propagación del virus.

Para obtener el antígeno a emplear en las pruebas para determinar el título de anticuerpos contra el virus, se realizó la propagación del virus con el mismo procedimiento descrito anteriormente, partiendo de una alícuota de 4 mL obtenida del cultivo semilla.

Determinación del título de anticuerpos contra el virus de influenza A (H1N1) por inhibición de la hemaglutinación.

Titulación del antígeno

Para iniciar con la técnica de inhibición de la hemaglutinación, primero se tituló el virus (antígeno) a emplear. Para esto se colocaron 50 μ L de diluyente para el antígeno (PBS 1X) en cada uno de los 12 pozos en 3 filas (A, B, C y D) de una microplaca de poliestireno con pozos con fondo en forma de "U". Posteriormente se agregaron 50 μ L de antígeno en el pozo de las primeras tres filas. Se realizaron diluciones logarítmicas base 2 seriadas de 1:2 a 1:4096 del antígeno, homogeneizando el contenido del pozo por lo menos 6 veces. Se agregaron 50 μ L de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 % en PBS 1X a cada pozo, se agitó, se cubrió la microplaca y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La cuarta fila de pozos recibió el mismo tratamiento que las anteriores, pero a ésta no se le agregó antígeno, por lo que funcionó como control de eritrocitos.

Una vez transcurrida la incubación se interpretó el resultado considerando la presencia o ausencia de hemaglutinación. El punto final de la titulación de antígeno se consideró como la dilución más alta del antígeno en la que se observe 100% de hemaglutinación.

Es importante realizar la titulación del virus antes de cada el ensayo de IH, pues es con este título que se ajustará la dilución a 8 UHA (unidades hemoaglutinantes) por cada 50 μ L.

Tratamiento de los sueros

Se tomaron 150 μ L de suero y se inactivó a 56°C por 30 minutos. Posteriormente se le agregó 100 μ L de caolín y 100 μ L de eritrocitos de pollo al 5%. Se dejaron reposar toda la noche a 4°C y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos.

El suero debe ser tratado antes de realizar la prueba para evitar la unión inespecífica de eritrocitos o anticuerpos a otros componentes del suero, como podrían ser el complemento, o proteínas con residuos similares al ácido siálico. Fue a partir de éstos sueros tratados que se realizaron los ensayos.

Titulación de los sueros

Se colocaron 50 μ L de PBS en una microplaca con pozos con fondo "U". Se añadieron 50 μ L de suero tratado en el primer pozo de cada hilera.

Se mezclaron y se hicieron diluciones dobles seriadas desde 1:10 hasta 1:4096. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de antígeno, previamente ajustado a 8 UHA en 50 μ L. Se cubrió la placa, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregaron 50 μ L de suspensión de eritrocitos al 0.5% en cada uno de los pozos. De nuevo, se cubrió la placa, se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente de 30 a 40 minutos, hasta que la sedimentación en el control de eritrocitos se observara bien delimitada.

En cada ensayo se incluyó un control de eritrocitos agregando sólo 50 μ L de eritrocitos al 0.5% en una fila completa, así como sueros controles positivos y negativos. Estos sueros controles contaban con un título muy bien establecido experimentalmente

Se leyeron los resultados considerando positivos los pozos con un aspecto similar al control de eritrocitos, ya que lo que se buscaba eran los pozos en donde se llevo a cabo la reacción de inhibición de la hemaglutinación. El título de cada suero se tomó como el último pozo en donde hubo inhibición de la hemoaglutinación.

Como control adicional una vez hecha la dilución del virus, ésta se retituló para asegurarnos de que efectivamente se encontraba en 8UHA/50 μ L.

Todo el protocolo de inhibición de la hemoaglutinación se encontraba estandarizado, basándose en el método anteriormente descrito por Kendal y el publicado por la OMS.²⁷⁻²⁸

La titulación de los sueros con los virus porcinos se realizó en las instalaciones de Bioseguridad 2 de la compañía Avimex.

Análisis estadístico

Los resultados de los títulos se encuentran expresados con base logarítmica, por lo que se aplicó el cálculo de media geométrica (MG), y se obtuvo el intervalo de confianza del 95%. Para fines de éste cálculo, aquellas muestras cuyos títulos se detectaran como 0, se les asignó la mitad de la mínima dilución, es decir, 5.

El análisis estadístico se realizó aplicando una prueba de ANOVA no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) y posteriormente una comparación múltiple de Dunn entre todos los grupos, en ésta última se tomó una $P < 0.001$.

Para llevar a cabo este análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad Prism versión 5.0.

Finalmente se calculó la seroprevalencia tomando los sueros como positivos si tenían un título mayor a 1:40. Para esto se agruparon nuevamente por fecha de toma de muestra.

Análisis de la similitud de la proteína inmunodominante hemaglutinina de diferentes cepas del virus de influenza A

Se comparó la similitud entre las secuencias de aminoácidos de la proteína hemaglutinina de las diferentes cepas, pues ésta proteína es uno de los principales componentes de las vacunas contra la influenza, ya que como se afirmó anteriormente, los anticuerpos que la reconocen tiene un papel importante en la protección.

Para esto se llevó a cabo un análisis *"in silico"*.

Primero se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de la hemaglutinina de las diferentes cepas de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/>), y mediante la herramienta con que, para el efecto cuenta el NCBI, se hizo un alineamiento múltiple de las cepas. Este alineamiento se guardó en formato FASTA, y después se analizó usando la herramienta del EBI (European Bioinformatics Institute) ClustalW2 con las secuencias de aminoácidos en formato FASTA como los datos crudos. Esta herramienta realizó un alineamiento por pares.

Predicción y análisis de conservación de epitopos de B en las estructuras tridimensionales de las HA entre la cepa vacunal porcina y el virus pandémico H1N1 2009

Se obtuvieron las estructuras tridimensionales en formato PDB de las hemaglutininas de las cepas A/swine/Texas/4199-2/98(H3N2), A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Mexico/4482/2009(H1N1) mediante el

servidor ModWeb²⁹. Estas estructuras se sometieron a un análisis de predicción de epitopos de linfocitos B mediante la herramienta ElliPro³⁰, que se encuentra disponible en la IEDB (Immune Epitope Data Base and Analysis Resource)³¹ en el portal www.immuneepitope.org. Este es un esfuerzo mantenido por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas en Maryland, EUA.

Una vez obtenidas las secuencias predichas de epitopos lineales, se analizaron utilizando la herramienta de Análisis de Conservación de Epitopos también disponible en el IEDB para obtener el porcentaje de identidad entre los posibles epitopos y las secuencias de aminoácidos de las HA.

Análisis de la conservación de la región de unión al receptor de ácido siálico entre la cepa A/Mexico/4482/2009(H1N1) y la cepa de referencia A/California/04/2009.

Por otro lado, debido a que el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación depende en gran medida de la cepa viral que se use, se realizó una comparación entre la cepa aislada en México por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (InDRE) de un paciente mexicano infectado con el virus de influenza pandémica, A/México/4482/2009(H1N1) y la cepa de referencia A/California/04/2009(H1N1).

Para esto, también se utilizaron las secuencias de la base de datos *Protein* del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) en el portal www.ncbi.nlm.nih.gov/protein y se descargaron las secuencias FASTA correspondientes a las hemaglutininas de ambas cepas, y se les realizó un alineamiento por pares de base usando la herramienta del EBI (European Bioinformatics Institute) ClustalW2 con las secuencias de aminoácidos en formato FASTA como los datos crudos.

Finalmente utilizando las estructuras tridimensionales obtenidas con anterioridad se realizó una comparación en Accelrys DS Visualizar, freeware que permite al usuario marcar regiones en la secuencia lineal de las proteínas, y verlas en una imagen de la estructura tridimensional. Éste funciona con los formatos PDB.

RESULTADOS

El nuevo virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009 es más parecido al virus estacional porcino A(H1N1), que a los virus estacionales humanos.

Debido a que el brote de influenza pandémica en nuestro país se debía a un nuevo virus, no había información previa de él. Con el fin de estudiar la posibilidad de que hubiera reactividad cruzada generada en la población por el contacto previo con virus de influenza estacionales o vacunales, se realizó un análisis *"in silico"* de las secuencias de la hemaglutinina de la cepa A/México/4482/2009(H1N1) aislada por el InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) de un paciente mexicano infectado con el virus de influenza pandémico, y las cepas vacunales para influenza estacional recomendadas por la OMS correspondientes a las temporadas 2007-2008, A/Solomon Islands/3/2006(H1N1) y A/Wisconsin/67/2005(H3N2), y 2008-2009 A/Brisbane/59/2007(H1N1), A/Brisbane/10/2007(H3N2). Así como las cepas vacunales de influenza porcina A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) a la que abreviaremos swH1N1 y A/swine/Texas/4199-2/98(H3N2), a la que abreviaremos swH3N2.

Aunque las vacunas estacionales son trivalentes, no se incluyeron en el análisis las cepas vacunales para el virus de influenza B, debido a que se sabía que el virus pandémico se trataba de un virus tipo A, y que entre diferentes tipos no hay recombinación.

Tabla 1.El virus pandémico tiene mayor similitud con la cepa vacunal porcina

HEMAGLUTININA - CEPAS COMPARADAS		PORCENTAJE DE SIMILITUD
A/Mexico/4482/2009(H1N1)	A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)	76
	A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	55
	A/Brisbane/10/2007(H3N2)	56
	A/Brisbane/59/2007(H1N1)	76
	A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1))	97
	A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2)	43

Los resultados nos muestran que no solo el virus pandémico tiene una secuencia de aminoácidos más similar al virus estacional porcino H1N1 (97%),

sino que además la similitud de éste mismo virus con las secuencias de las cepas estacionales es de 76%.

Por otro lado como es de esperarse la similitud entre las secuencias de las hemaglutininas del virus pandémico, que es subtipo H1 y las cepas vacunales subtipo H3 es la más baja con un rango de 43 a 56%. En donde la porcina es la que muestra el menor porcentaje 43%.

Hay regiones antigénicas altamente conservadas entre la cepa de influenza porcina A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y la del virus pandémico A/México/4489/2009(H1N1).

Las similitudes encontradas entre los virus pandémico y porcino sugiere la posibilidad de que compartan determinantes antigénicos inmunodominantes. Con el fin de analizar esta posibilidad, se predijeron los epitopos lineales que son reconocidos por el linfocito B en la cepa del virus de influenza pandémico y después mediante la herramienta de análisis de conservación de epitopos se analizó su presencia en la secuencia lineal de aminoácidos de la cepa vacunal porcina.

Tabla 2. Alta conservación de epitopos de B entre el virus de influenza pandémico y la cepa vacunal porcina H1N1.

A/Mexico/4482/2009(H1N1)					A/sw/H1N1	A/sw/H3N2
No.	Posición de inicio	Posición de termino	Péptido	Número de residuos	Identidad	Identidad
1	403	434	MNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLD	32	87.5%	21.88%
2	498	519	NGTYDYPKYSEEAKLNREEIDG	22	100.0%	27.27%
3	370	379	HQNEQGSGYA	10	100.0%	60.00%
4	488	491	CDNT	4	100.0%	50.00%
5	350	364	IAGFIEGGWTGMVDG	15	93.3%	86.67%

La tabla 3 nos indica en su primera columna el número de epitopo predicho, luego el número de aminoácido dentro de la secuencia total de la HA en el que empieza el péptido que corresponde al epitopo y el número de aminoácido en el que termina, seguido de la secuencia de dicho péptido, así como el número total de residuos de aminoácidos que lo componen. Posteriormente nos indica el porcentaje de identidad de cada epitopo en las secuencias de las cepas porcinas de influenza.

Podemos observar (tabla 3) que la identidad entre los epitopos predichos es muy alta entre ambas secuencias. Incluso para los epitopos 2,3 y 4 la identidad es del 100%. Sin embargo, como se ha visto que las regiones en la cabeza de la hemaglutinina son a las que preferentemente se unen los anticuerpos protectores, por lo tanto nos interesó ubicar estos epitopos predichos y conservados.

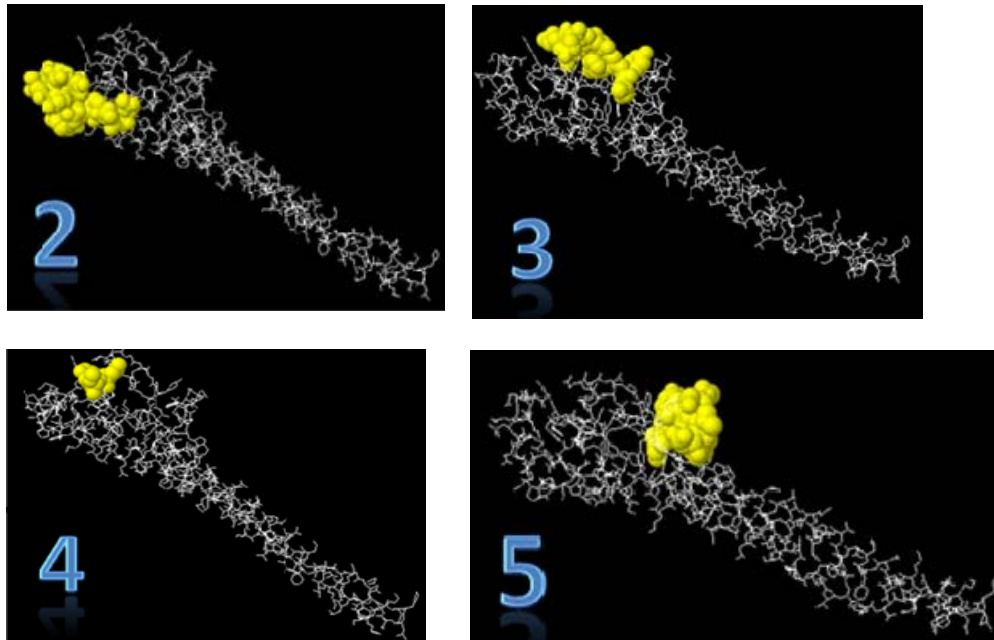


Figura 1. Localización de los epitopos de B en la estructura de la hemaglutinina del virus de influenza pandémico. Estas imágenes se obtuvieron de ElliPro, herramienta disponible en el IEDB. El número indica que epitopo es el que se ve ilustrado. Estos epitopos se encuentran presentes también en la hemaglutinina de swH1N1 y solo el epitopo número 5 se encuentra presente también en la hemaglutinina del virus de influenza swH3N2.

Sin embargo en lo que respecta al virus porcino swH3N2, los epitopos predichos en general casi no se conservan, con excepción del epitopo 5 muestra una identidad del 86.67%.

Comparación de la similitud entre las hemaglutininas de las cepas de influenza A/México/4482/2009(H1N1) y A/California/04/2009(H1N1).

Para determinar las posibles diferencias de nuestros datos de HI con los obtenidos por otros grupos en el extranjero ya que los datos de HI dependen directamente de la cepa utilizada, se realizó una comparación *"in silico"* entre las secuencias de la cepa A/México/4482/2009(H1N1) aislada por el InDRE de un paciente mexicano infectado con el virus de influenza pandémico y la cepa A/California/04/2009(H1N1) que es la referencia internacional. Se encontró que la secuencia de aminoácidos correspondiente a la hemaglutinina del virus de influenza A/México/4482/2009 difiere en tres aminoácidos con respecto a la cepa A/California/04/2009, los cuales corresponden a: una serina por una prolina en la posición 30, una alanina por una treonina en la posición 144, y una valina por una isoleucina en la posición 268. Esto representa el 99.4% de similitud entre ambas proteínas. Se prestó atención especial a la región de unión al ácido siálico, debido a que el fundamento de la prueba de IH depende de que los anticuerpos puedan interferir en el reconocimiento de este sitio con el ácido siálico de los eritrocitos, en este caso de pollo. Ninguna de las mutaciones afecta a los residuos de aminoácidos que pertenecen directamente a los epitopos reportados para la HA de

Subtipo H1.³²

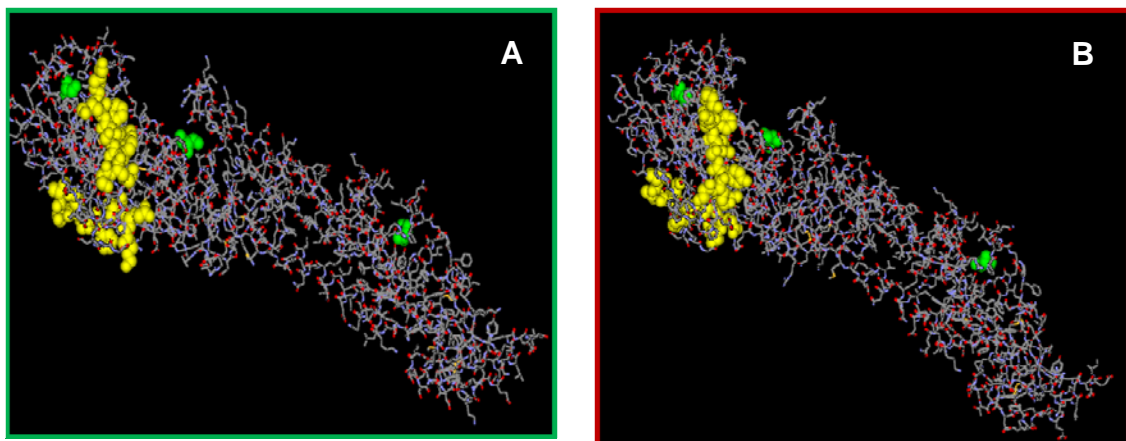


Figura 2. Ninguno de los aminoácidos que cambian entre las cepas se encuentra en la región de unión al receptor de la hemaglutinina. Modelaje de las hemaglutininas en donde se indica con verde los aminoácidos que cambian en sus secuencias y con amarillo la zona de unión al receptor de ácido siálico. A. A/Mexico/44482/2009(H1N1) y B. A/California/04/2009 (H1N1)

Al localizar las variaciones entre ambas cepas (señaladas con verde en la Figura 2), se observó que ninguna de ellas se encuentra directamente en la región de unión al receptor de ácido siálico, misma que en la Figura 1 se señala con el color amarillo. El alto grado de similitud entre ambas cepas, y que ninguno de los aminoácidos variantes se encontrara en la región de unión al receptor de ácido siálico nos indica que los resultados utilizando ambas cepas para el análisis de los sueros pueden ser comparables.

Sujetos analizados

Se incluyeron un total de 317 sueros en el estudio. Con un rango de entre 3 meses a 74 años, y con fechas de toma de muestra de entre diciembre de 2007 y noviembre de 2009. Ninguno de los sujetos tenía síntomas de enfermedad respiratoria al momento de la toma de muestra. Los datos demográficos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 3. Características de los sueros a los que se les realizó el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación.

No. Suero*	Sexo		Edad (años)	Fecha de toma de muestra
	Mujeres	Hombres		
Del 001-022	9	12	2-46	del 10/12/2007 al 19/12/2007
del 023-103	40	34	3-57	del 07/01/2008 al 30/12/2008
del 104-160	28	14	0.8 a 56	del 02/02/2009 al 24/04/2009
del 161-273	27	79	0.3 a 55	del 20/08/09 al 17/10/2009
del 274-373	46	28	0.5 a 64	20/08/09 al 09/11/2009

*El número de suero es aleatorio y consecutivo. Se asignó como medida de control de las muestras en el laboratorio

A cada suero se le determinó el título de anticuerpos en contra de la cepa A/México/4482/2009(H1N1) mediante ensayo de la inhibición de la hemoaglutinación.

El virus pandémico es altamente inmunogénico y se encontraron títulos de anticuerpos en algunos casos desde diciembre de 2007

Se agruparon los sueros de acuerdo a su fecha de toma de muestra de la siguiente forma: En el grupo denominado como 2007-2008 se incluyeron todos los sueros colectados entre diciembre del 2007 y diciembre del 2008. El grupo denominado 2009 pre-epidemia incluye todos los sueros colectados antes del

16 de abril de 2009, fecha en la cual el actual Secretario de Salud; José Ángel Córdova Villalobos, declara emergencia sanitaria en el territorio nacional. Mientras que el grupo denominado 2009 post-epidemia incluye a los sueros tomados durante ese mismo año, pero posteriormente al 16 de abril de 2009.

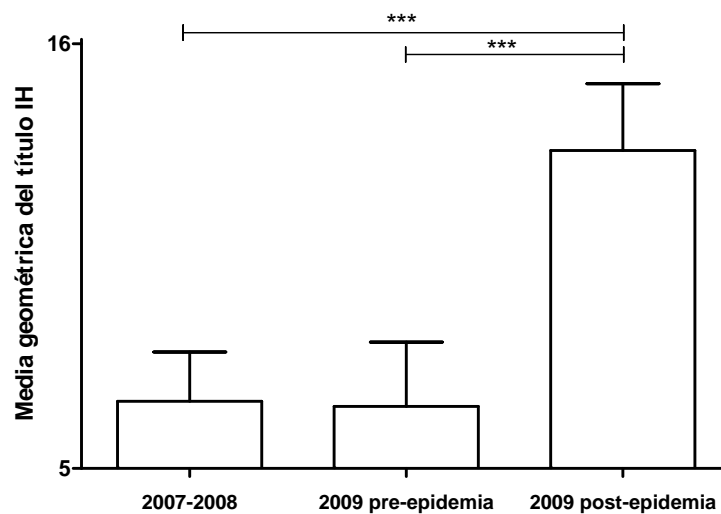


Figura 3. **Media geométrica de los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A (H1N1) en el periodo 2007-2009.** Se analizó el título de anticuerpos anti-HA utilizando un ensayo de inhibición de la hemoaglutinación. Se presenta la media geométrica de los sueros analizados. Se realizó una prueba estadística ANOVA de 1 vía no paramétrica de Kruskal-Wallis y posteriormente un análisis de Dunn para comparar los 3 grupos entre sí. *** $p < 0.001$. La gráfica tiene el 5 como origen.

No hay reactividad cruzada entre las cepas porcinas y el virus pandémico.

Se graficó la media geométrica de los títulos obtenidos al analizar los virus porcinos swH1N1 y swH3N2

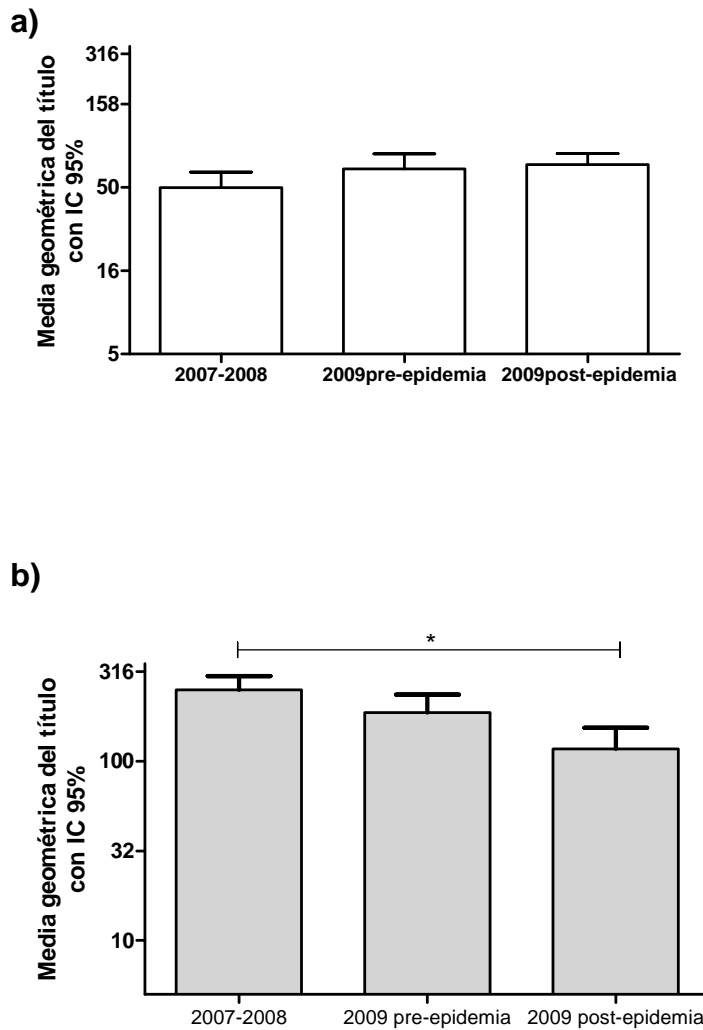


Figura 4. . Los títulos de anticuerpos anti-swH1N1 se han mantenido desde diciembre del 2007, mientras que los anticuerpos contra swH3N2 han disminuido durante el mismo periodo.

Se analizaron los sueros por el método de inhibición de la hemoaglutinación y los resultados se agruparon por cepa viral usada durante el ensayo. **a)** swH1N1. **b)** swH3N2. En ambos casos se encontró diferencia significativa entre el periodo 2007-2008 y 2009 post-epidemia, y se realizó una prueba estadística ANOVA de 1 vía no paramétrica de Kruskal-Wallis y posteriormente un análisis de Dunn para comparar los 3 grupos entre sí. * $p < 0.1$. La gráfica tiene el 5 como origen.

Como podemos ver en la figura 4, la media geométrica de los títulos de anticuerpos contra swH1N1 se mantiene durante todos los periodos, mientras que disminuye para swH3N2. Por otro lado los anticuerpos que reconocen a swH3N2 muestran una media geométrica mucho más alta.

Los anticuerpos contra los virus porcinos circulantes en la población desde diciembre de 2007 no presentan reactividad cruzada con el virus pandémico.

Se compararon las medias geométricas de los títulos obtenidos para todos los virus.

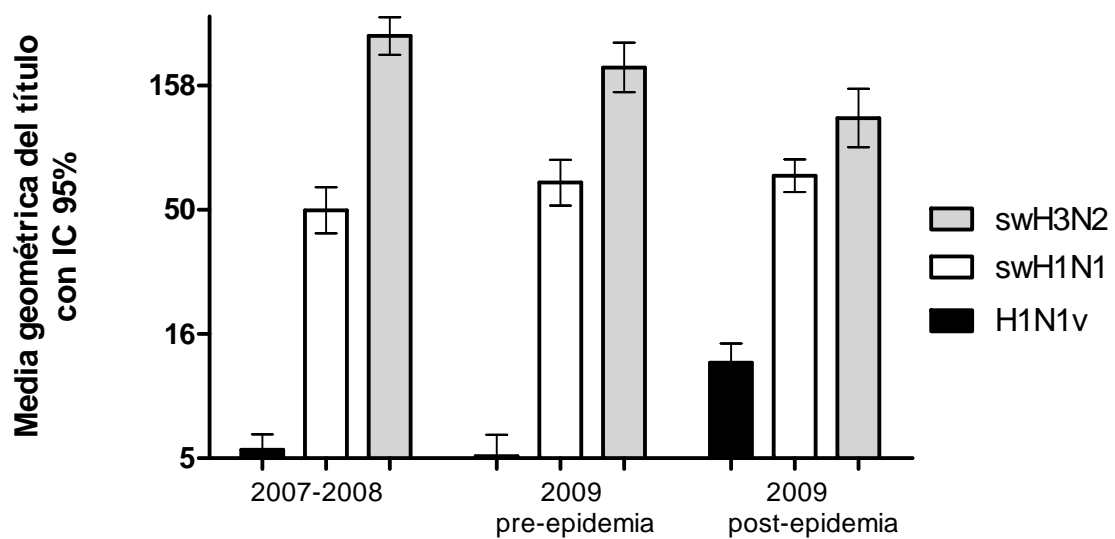


Figura 5. Comparación entre las medias geométricas de los títulos de anticuerpos contra todas las cepas virales en función de la fecha de toma de muestra. La gráfica tiene como origen 5.

Los anticuerpos contra swH1N1 y swH3N2 han mantenido sus valores serológicos altos. Para swH1N1 los títulos se han mantenido, pero para swH3N2 disminuyen para el periodo 2009 post-epidemia.

Tabla 4. Concentrado de resultados

Periodo	Cepa viral	No. de sujetos	MG del título IC 95%Total
2007-2008	H1N1v	95	5.40 (4.68-61.62)
	swH1N1	95	49.77 (6.23-40.20)
	swH3N2	95	250.5 (210.4-298.2)
2009 pre-pandemia	H1N1v	42	5.1 (4.17-6.22)
	swH1N1	42	64.34 (52.04-79.54)
	swH3N2	42	187.1 (148.7-235.4)
2009 post-pandemia	H1N1v	178	12.13 (10.17-14.48)
	swH1N1	178	68.56 (58.97-79.70)
	swH3N2	178	117.1 (89.40-153.5)

La seroprevalencia contra swH3N2 disminuye en el periodo 2009 post-epidemia

Una vez obtenidos los títulos de anticuerpos en nuestro universo de estudio, se procedió a calcular la seroprevalencia, agrupando los datos nuevamente por fecha de toma de muestra. Se tomaron como positivos aquellos sueros cuyo título fue mayor o igual a 1:40.³³ Debido a que se ha reportado que a partir de éste título el riesgo de presentar síntomas en un 50%³³.

Se observa que en el caso de swH3N2, la seroprevalencia disminuye durante el mismo periodo en el que aumenta la seroprevalencia contra H1N1v. Este podría ser un fenómeno que se conoce como de competencia que se ha descrito con anterioridad en las epidemias de influenza.²⁴

Toma de muestra	2007-2008	2009 pre	2009 post
Muestras totales	95	42	175
Muestras positivas	3	1	42
Seroprevalencia	3.16%	2.38%	22.29%

Tabla 5. Hay seroprevalencia contra el virus de influenza pandémico cepa A/México/4482/2009(H1N1) desde el periodo 2007-2008 y se incrementa 7 veces durante el periodo correspondiente a 2009 post-epidemia. Calculado tomando como positivos los sueros que tuvieran un título de al menos 1:40.

Toma de muestra	2007-2008	2009 pre	2009 post
Muestras totales	95	42	175
Muestras positivas	68	33	136
Seroprevalencia	71.6%	78.6%	77.7%

Tabla 6. La seroprevalencia contra el virus de influenza estacional porcina cepa vacunal A/swine/Iowa/00239/2004(H1N1) se mantiene constante en todos los periodos. Calculado tomando como positivos los sueros que tuvieran un título de al menos 1:40.

Toma de muestra	2007-2008	2009 pre	2009 post
Muestras totales	95	42	175
Muestras positivas	95	40	133
Seroprevalencia	100.0%	95.2%	76.0%

Tabla 7. La seroprevalencia contra el virus de influenza porcina estacional cepa vacunal A/swine/Texas/4199-2/98(H3N2) disminuye. Calculado tomando como positivos los sueros que tuvieran un título de al menos 1:40.

Podemos observar que la seroprevalencia contra H1N1v, se va adquiriendo rápidamente entre la población, pues entre los resultados observados en el primer cuarto del año, y los de los últimos tres cuartos hay un aumento de casi 10 veces y en comparación con la reportada en 2007-2008 el aumento es de 7 veces.

El virus porcino swH1N1 también registra seroprevalencia en todos los periodos, pero esta es mucho más alta y se mantiene constante.

DISCUSIÓN.

La nueva cepa de virus de influenza A(H1N1) que emergió en México el pasado marzo de 2009, fue declarada emergencia sanitaria en territorio nacional en abril del mismo año, para mayo ya se había extendido a más de 46 países, y era responsable de más de 13000 casos³⁴ fue la protagonista de la primera pandemia de influenza de éste siglo. Sin embargo esta pandemia era una amenaza esperada, pues la humanidad se ha visto azotada por pandemias de influenza cíclicamente, lo que nos ha obligado a contar con organismos nacionales e internacionales de vigilancia, para poder prevenir la dispersión y predecir el curso de dichas pandemias.³⁵

Como se trata de un nuevo virus no hay una descripción previa, y al encontrarnos en el epicentro de la epidemia surge la necesidad de conocer el comportamiento del virus. Por ello, se empezó por compararlo con las cepas vacunales de las temporadas 2007-2008; A/Solomon Islands/3/2006(H1N1) y A/Wisconsin/67/ 2005(H3N2) y 2008-2009 A/Brisbane/59/2007(H1N1), A/Brisbane/10/2007(H3N2). para intentar identificar sus similitudes con otros virus conocidos. Debido a que la hemaglutinina es uno de los antígenos principales de los virus de influenza tipo A,³⁶ y que nuestro método de análisis serológico se basa en el reconocimiento de esta proteína, fue esta la región que se decidió analizar. Se obtuvo una similitud con la cepa vacunal porcina swH1N1 muy cercana al 100%, lo cual fue mayor a la similitud encontrada con las cepas vacunales de influenza estacional.

Ahora sabemos que H1N1v es un virus de triple recambio que contiene segmentos de RNA clásicos de virus porcinos del linaje euroasiático, de influenza aviar, y de virus clásico porcino del linaje de Norteamérica. El segmento que corresponde a la hemaglutinina es de éste último tipo.³⁷ Y la cepa A/swine/lowa/00239/2004(H1N1) corresponde a la cepa vacunal, de influenza porcina que se usa en América del Norte, por lo que resulta congruente que las secuencias hayan sido tan parecidas.

Por lo anterior, se decidió realizar un análisis más detallado en el que se determinaron los epitopos de B, pues son estos los que son reconocidos por

anticuerpos³⁸, al observar que todos los epitopos predichos se conservaban en ambas cepas y que además se encontraban en la región globular de la HA, que es donde se encuentran las principales determinantes antigénicas reconocidas por los anticuerpos protectores¹⁴, se decidió añadir al análisis serológico el virus porcino, bajo la premisa de que podría haber reacción cruzada entre los anticuerpos que reconocen a estos virus.

De acuerdo con el protocolo genérico para la vigilancia de la influenza generado por la Pan American Health Organization (PAHO) en conjunto con el Centers for Disease Control and Prevention (CDC), coleccionar especímenes clínicos para el cultivo viral es crítico en cuanto a vigilancia se refiere. Solo los cultivos de virus aislados son capaces de proveer de información específica en cuanto a las cepas circulantes, y de los nuevos subtipos de influenza A emergentes que puedan provocar una nueva pandemia.³⁹ Por esto se prefirió utilizar la cepa aislada por el InDRE en nuestros ensayos. Sin embargo con la intención de estudiar si había modificaciones en el sitio de unión al receptor de ácido siálico entre ambas proteínas, pues son los anticuerpos que impiden la unión de la HA con al ácido siálico los que se miden durante el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación, se realizó el análisis *"in silico"* con la cepa de referencia A/California/04/2009. Con el resultado de que de las tres mutaciones encontradas entre ambas secuencias, ninguna cae en la zona de unión al receptor de ácido siálico. Aunque esto no es determinante, pues debido a que la hemaglutinina es una proteína con estructura terciaria, aún una mutación puntual puede cambiar la estructura debido a las interacciones entre aminoácidos, que dependen directamente de sus propiedades fisicoquímicas.

El análisis de nuestros resultados, sugieren que no había inmunidad de grupo en la población muestreada contra el virus pandémico AH1N1, pues la media geométrica de los periodos 2007-2008 y 2009 pre-epidemia nos dio un valor muy cercano a 5 y debemos recordar que ese es el número que se asignó a las sueros cuyo título resultó no detectable, con fines del cálculo y debido a que es la mitad de la primera dilución. Esta falta de reconocimiento por parte del sistema inmune de la población en general, es una característica fundamental de las cepas pandémicas de influenza A.⁴⁰

En la figura 3, la media geométrica de los títulos determinados en los sueros cuya toma de muestra fue después de abril tuvo un aumento de más del doble con respecto a las medias registradas en los periodos anteriores. Lo que sugiere que la población responde a la exposición a H1N1v montando una respuesta de anticuerpos, incluso en ausencia de enfermedad-

La seroprevalencia para los periodos 2007-2008 y 2009 pre-epidemia aunque fue muy baja indica que hubo reconocimiento de los sueros por el antígeno, lo que puede significar que el virus se encontraba circulando con anterioridad y hubo un cambio en el ambiente o en el mismo virus que propicio el brote de influenza, o que algún otro virus todavía no descrito con el que se presenta reacción cruzada se encuentra o se encontraba circulando y fueron los anticuerpos generados contra éste virus lo que detectamos en el ensayo de IH.

Por otro lado es muy interesante que la seroprevalencia y la media geométrica que se determinó en los sueros contra swH1N1 haya resultado tan alta, y con tan baja correlación con los títulos contra el H1N1v. En un estudio en el que se analizó la relación entre los títulos de anticuerpos contra el virus porcino cepa estacional A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y los títulos contra el virus pandémico 2009 (H1N1) en pacientes enfermos de influenza A(H1N1) confirmados mediante RT-PCR, se observó que aunque los pacientes tuvieron títulos altos contra el virus porcino, éstos anticuerpos no los protegieron contra la enfermedad. Y dado nuestro previo análisis *in silico* que muestra la alta similitud no solo entre las secuencias, sino también entre los epitopos, resulta sorprendente que no exista reactividad cruzada, lo que nos lleva a pensar que probablemente la virulencia de H1N1v no dependa exclusivamente de HA, o que ésta proteína cambie su forma estructural o sus zonas expuestas al acomodarse en forma de trímero, que es como se encuentra en su estado natural,⁷ y no permita el reconocimiento por los anticuerpos que reconocen a swH1N1.

Por otro lado swH3N2 mostró la media geométrica y la seroprevalencia más alta, pero al igual que swH1N1 no muestra reactividad cruzada con H1N1v. Lo cual tal vez no resulta tan sorprendente pues se trata de virus muy diferentes entre sí.

Sin embargo a diferencia de swH1N1 la tendencia en la seroprevalencia de swH3N2 fue descendente. En la literatura se cita que durante las pandemias, los virus pandémicos compiten con los circulantes para establecerse en el hospedero,⁴¹ y este es el efecto que podemos estar observando.

La pandemia de influenza reportada en la cual se han perdido más vidas humanas fue la de 1918, con alrededor de 50 millones de defunciones⁴². Se piensa que el responsable de tan alta mortandad fue un virus de influenza A H1N1 aviar muy virulento que se pudo adaptar a los cerdos y de ahí transmitirse a los humanos.⁴³ De la misma forma se cree que el virus pandémico actual, proviene de esta cepa que evolucionó divergentemente en humanos y cerdos, y ahora ha dado un nuevo salto, que le permitió al virus infectar las células humanas y transmitirse de uno a otro. Y aunque la alta seroprevalencia registrada contra los virus porcinos apoya esta idea, no se ve un efecto de respuesta cruzada entre los anticuerpos que reconocen estos virus y H1N1v.

Es importante conocer los antecedentes en cuanto a la epidemia se refiere, pues como se ha visto con anterioridad las epidemias de influenza normalmente tienen varios picos, y se ha registrado que en algunos casos las olas subsecuentes resultan más virulentas que la inicial. Si monitoreamos la respuesta que tiene la población a la pandemia, contamos con más armas para controlar la propagación y proteger a la población.

En este caso nuestros resultados muestran que la exposición al nuevo virus genera una respuesta inmune que se evidencia por la producción de anticuerpos que en este caso son específicos contra la hemaglutinina de dicho virus. y se están generando anticuerpos específicos, lo que puede ser importante para prevenir la infección o a resolverla de forma más rápida y eficiente. Hecho que se reflejaría en una menor mortalidad y severidad de los síntomas.

Este estudio debe continuarse en los meses siguientes, para seguir evaluando la respuesta inmune humoral de la población en general, así también sería importante expandir el universo de estudio para poder contar con una muestra representativa de la población al menos del Distrito Federal, que es la ciudad

más poblada de nuestro país y encabeza junto con el Estado de México y San Luis Potosí las estadísticas de casos de acuerdo a la Secretaría de Salud.

CONCLUSIÓN

El virus de influenza pandémico es inmunogénico y está generando inmunidad de grupos en la población. Se detectaron anticuerpos en la población desde diciembre de 2007 lo que sugiere que el virus pandémico ya se encontraba circulando en forma no pandémica desde entonces. La seroprevalencia contra el mismo aumenta 7 veces en el periodo posterior a la epidemia. No se encontró inmunidad cruzada por otros virus porcinos. El virus en su forma pandémica podría estar compitiendo con otros virus de influenza en la generación de inmunidad de grupos.

REFERENCIAS

1. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*. 2002 Aug 19;20(25-26):3068-87.
2. Tamura S, Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis*. 2004 Dec;57(6):236-47.
3. Salomon R, Webster RG. The influenza virus enigma. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):402-10.
4. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog*. 2007 Oct 19;3(10):1470-6.
5. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D49-53.
6. Hampson AW, Mackenzie JS. The influenza viruses. *Med J Aust*. 2006 Nov 20;185(10 Suppl):S39-43.
7. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:531-69.
8. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4620-4.
9. Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*. 2009 Jan;227(1):75-86.
10. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):997-1001.
11. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet*. 2002 Dec 7;360(9348):1831-7.
12. Melendi GA, Laham FR, Monsalvo AC, Casellas JM, Israele V, Polack NR, et al. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics*. 2007 Aug;120(2):e410-5.
13. Hicks JT, Ennis FA, Kim E, Verbonitz M. The importance of an intact complement pathway in recovery from a primary viral infection: influenza in de complemented and in C5-deficient mice. *J Immunol*. 1978 Oct;121(4):1437-45.
14. Gerhard W. The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001;260:171-90.
15. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001 Aug;2(8):675-80.
16. Ramphal R, Cogliano RC, Shands JW, Jr., Small PA, Jr. Serum antibody prevents lethal murine influenza pneumonitis but not tracheitis. *Infect Immun*. 1979 Sep;25(3):992-7.
17. Knossow M, Skehel JJ. Variation and infectivity neutralization in influenza. *Immunology*. 2006 Sep;119(1):1-7.

18. Skehel J. An overview of influenza haemagglutinin and neuraminidase. *Biologicals*. 2009 Jun;37(3):177-8.
19. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003 Nov 22;362(9397):1733-45.
20. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jan;12(1):15-22.
21. Organization WH. WHO European guidance for influenza surveillance in humans In: Europe WROf, editor. Copenhagen; 2009. p. 79.
22. Van Reeth K, Brown IH, Durrwald R, Foni E, Labarque G, Lenihan P, et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza Other Respi Viruses*. 2008 May;2(3):99-105.
23. Dejpichai R, Laosiritaworn Y, Phuthavathana P, Uyeki TM, O'Reilly M, Yampikulsakul N, et al. Seroprevalence of antibodies to avian influenza virus A (H5N1) among residents of villages with human cases, Thailand, 2005. *Emerg Infect Dis*. 2009 May;15(5):756-60.
24. Robinson JL, Lee BE, Patel J, Bastien N, Grimsrud K, Seal RF, et al. Swine influenza (H3N2) infection in a child and possible community transmission, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2007 Dec;13(12):1865-70.
25. W.M.A. Declaration of Helsinki. 1989; Helsinki, Finland; 1989.
26. I.C.H. Normas de Buenas Prácticas Clínicas. 1996; 1996.
27. Kendal AP PM, Skehel JJ. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Geneva: World Health ORganization. 1982.
28. Organization WH. Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. In: Robert G. Webster NC, Scott Krauss, editor. 2 ed: WHO Department of Communicable Disease Surveillance and Response; 2002.
29. Pieper U, Eswar N, Webb BM, Eramian D, Kelly L, Barkan DT, et al. MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(Database issue):D347-54.
30. Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:514.
31. Peters B SJ, Bourne P, Bui HH, Buus S, Doh G, Fleri W, Kronenberg M, Kubo R, Lund O, Nemazee D, Ponomarenko JV, Sathiamurthy M, Schoenberger S, Stewart S, Surko P, Way S, Wilson S, Sette A. The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. *PLoS Biol*. 2005;3(3).
32. Deem MW, Pan K. The epitope regions of H1-subtype influenza A, with application to vaccine efficacy. *Protein Eng Des Sel*. 2009 Sep;22(9):543-6.
33. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *New England Journal of Medicine*. 2009;361:1-8.
34. Organization WH. Influenza A(H1N1). 2009 [cited; Available from:
35. Update: novel influenza A (H1N1) virus infections - worldwide, May 6, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 May 8;58(17):453-8.
36. Osterlund P, Pirhonen J, Ikonen N, Ronkko E, Strengell M, Makela SM, et al. Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons. *J Virol*. 2010 Feb;84(3):1414-22.

37. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J, Jr. An Influenza A H1N1 Virus Revival - Pandemic H1N1/09 Virus. *Infection*. 2009 Sep 18.
38. Tolar P, Meckel T. Imaging B-cell receptor signaling by single-molecule techniques. *Methods Mol Biol*. 2009;571:437-53.
39. Prevention CfDCa. Prevention and Control of Influenza. *MMWR*. 2007;56(No.RR-6).
40. Chen J, Deng YM. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virology*. 2009;6:30.
41. Qi X, Lu C. [Swine influenza virus: evolution mechanism and epidemic characterization--a review]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2009 Sep 4;49(9):1138-45.
42. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. 2007 Jul 26;25(30):5637-44.
43. Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, Setterquist SF, Olsen CW, Alavanja MC. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis*. 2007 Dec;13(12):1871-8.