



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**BÚSQUEDA DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA HEMAGLUTININA
DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1) pdm09 EN MÉXICO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

pQ.F.B. JORGE ARTURO MARTÍNEZ FILIO.

ASESOR: M. EN C. MARÍA GUADALUPE AVILÉS ROBLES

**COASESORES: Q.B.P. NOÉ ESCOBAR ESCAMILLA
Q.F.B. ILIANA ALEJANDRA CORTÉS ORTÍZ**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Búsqueda de variantes genéticas en la hemaglutinina del virus de la Influenza A (H1N1)
pdm09 en México

Que presenta el pasante: Jorge Arturo Martínez Filio
 Con número de cuenta: 407002454 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de diciembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
VOCAL	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
SECRETARIO	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
1er SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

*“Así hay que hablarle a vuestro
entendimiento, que sólo aprende por
medio de los sentidos lo que hace
después digno de la inteligencia”.*

Dante Alighieri

La Divina Comedia (Canto IV, Cielo)

DEDICATORIA

Dedico este trabajo como parte de mi esfuerzo, dedicación y conocimiento adquirido por 5 años a mi familia primeramente porque ellos nunca me negaron las cosas más esenciales para poder continuar con mis estudios y apoyarme moralmente, al InDRE porque sin su ayuda no existiría toda la información y resultados condensados en éste escrito y a la FES-Cuautitlán por darme la formación necesaria para enfrentarme ante los retos que me imponga la ciencia.

Que sirva de apoyo a los estudiantes que deseen consultarlo porque les ahorrará tiempo en cuanto a consulta de artículos y algunas páginas web, además de no ser muy complejo ni extenso para consultar.

AGRADECIMIENTOS

- Doy gracias a Dios ante todo por darme la oportunidad de vivir.
- Agradezco a mis padres por darme la vida, cuidarme, darme su cariño y apoyo incondicional, guiarme por el sendero del bien, inculcarme lo mejor de ellos y, aconsejarme para poder defenderme en la vida y ser una mejor persona cada día, son los seres humanos que más quiero.
- A mi único hermano, que a veces despistado y gruñón es una buena persona, trabajador y con más experiencia en la vida que yo, ya se ve con una responsabilidad en camino. Doy gracias a Dios por darme un buen compañero que estará conmigo toda la vida.
- A mis profesores de la FES-Cuautitlán desde el primer semestre hasta el noveno ya que sin ellos no tendría el conocimiento ni la preparación para enfrentarme a los retos que me impondrá el mundo. A lo anterior menciono específicamente a los profesores (as): Antonio Osornio, Elia Granados, Enrique Ángeles, María Esther Revuelta, Víctor Zendejas, Guadalupe Avilés y Andrea Osnaya porque he desarrollado hacia ellos un profundo cariño, respeto y admiración por su dedicación, conocimiento y porque son personas muy buena onda.
- A los profesores que conformaron mi jurado: Susana Elisa Mendoza Elvira, Ladislao Palomar Morales, María Guadalupe Avilés Robles, Leticia Cubillo Carrillo y Maritere Domínguez Rojas porque realizaron lo necesario para que mi trabajo esté lo mejor presentable y completo, además de estar titulado.
- A mi asesora y jurado la profesora María Guadalupe Avilés Robles por ser buena onda y tolerante conmigo, en los semestres en que me dio clase nunca me dejó solo cuando necesité de su ayuda. Además de sus clásicas frases que todo alumno que cursa con ella conoce muy bien.
- A todos los compañeros que conocí en la FES-C porque compartí con ellos experiencias bien chidas en toda la carrera como los fines de semana, dentro de las mismas clases y en las quemadas de batas.

- A mis amigos que desde la infancia he tenido porque son “la banda” y son como mis hermanos, porque he compartido con ellos casi toda mi vida y me han tolerado cuando los rechazaba porque ponía primero mis estudios antes que ellos (Alejandro Flores, David Aragón, Erick Temoczin, Gustavo Maturano, Christian Solano, Salvador Salazar y Víctor Rangel).
- Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) por aceptarme primeramente como candidato a servicio social y después como tesista, además de los cursos que impartieron y amablemente me invitaron, aumentando más mis conocimientos y reforzando los que ya tenía.
- Dentro del punto anterior le agradezco específicamente al laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular (DITI) por abrirme sus puertas y ayudarme en mi servicio social y titulación.
- A mis asesores del InDRE: Iliana Cortés y Noé Escobar por enseñarme lo que ellos saben, también porque me ayudaron a mi proceso de titulación, además son personas muy nobles y amables en todo lo que les pedí.
- A Maribel González, Elizabeth Andrade, América Mandujano, Pilar Torres, Juan Carlos, Isaura, Misael, el Dr Mario Torres, Ernesto e Iram Olivera, todos ellos miembros del laboratorio de diagnóstico y tipificación molecular (DITI) porque al igual que mis asesores son personas muy amables y accesibles en lo poco o mucho que les pedí su ayuda, y en ausencia de ellos (mis asesores), se hacían cargo de que no se parara ningún día mi trabajo.
- Al virus de la Influenza A (H1N1) pdm09 porque sin su grandísimo material genético no estuviera terminado este trabajo.

ÍNDICE

Pag

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición e historia de la Influenza A.....	1
1.2 El virus Influenza tipo A	3
1.2.1 Envoltura.....	4
1.2.2 Genoma.....	4
1.2.3 Nucleoproteína	5
1.2.4 Polimerasa.....	6
1.2.5 Proteína M1	6
1.2.6 Proteína M2.....	7
1.2.7 Proteínas no estructurales	7
1.2.8 Hemaglutinina	8
1.2.9 Neuraminidasa.....	9
1.3 Ciclo de Replicación	10
1.4 Variación genética.....	11
1.4.1 Derivado antigénico (antigenic drift)	12
1.4.2 Cambio antigénico (antigenic shift)	13
1.5 Origen del virus Influenza A (H1N1) pdm09	15
1.6 La primera pandemia del siglo XXI.....	16
1.7 Reservorios	17
1.8 Modo de transmisión y enfermedad clínica.....	18
1.9 Respuesta inmune y patogenia	19
1.9.1 Características patológicas.....	19
1.9.2 Respuesta inmune del hospedero	20
1.10 Epidemiología	21
1.10.1 Morbilidad.....	21

1.10.2	Distribución de casos confirmados de Influenza A (H1N1) pdm09 en México ..	22
1.11	Prevención y Tratamiento.....	25
1.11.1	Adamantanos.....	25
1.11.2	Inhibidores de la Neuraminidasa.....	26
1.11.3	Otros antivirales contra la Influenza.....	26
1.11.4	Vacunas.....	26
1.11.5	Resistencia de la Influenza a los medicamentos	27
1.12	Diagnóstico	27
1.12.1	Aislamiento viral.....	28
1.12.2	Métodos inmunológicos.....	28
1.12.3	Métodos moleculares.....	29
1.13	La tecnología del PCR.....	29
1.13.1	Fundamento del PCR.....	29
1.13.2	RT-PCR en tiempo real	29
1.13.3	Cinética de amplificación en una PCR	31
1.13.4	Diagnóstico de Influenza A (H1N1) pdm09 por RT-PCR en tiempo real, Protocolo del CDC	32
2.	JUSTIFICACIÓN	34
3.	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo General	35
3.2	Objetivos Particulares.....	35
4.	DIAGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES.....	36
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	37
5.1	Selección de muestras.....	37
5.2	Subtipificación de la HA	37
5.3	Preparación de la mezcla de reacción.....	39
6.	RESULTADOS	41
7.	DISCUSIÓN.....	46

8. CONCLUSIONES	50
9. REFERENCIAS CITADAS	51
10. PÁGINAS WEB CITADAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Pag

Figura 1. Estructura general del virus de la Influenza A.....	3
Figura 2. Estructura genómica de los virus de la Influenza A	5
Figura 3. Hemaglutinina de los virus de Influenza tipo A	9
Figura 4. Esquema del proceso de replicación del virus de la Influenza	11
Figura 5. Variantes más importantes originadas por reasociaciones de segmentos genómicos que han afectado a humanos	14
Figura 6. Diagrama del origen de la Influenza A (H1N1) pdm09	15
Figura 7. Los diferentes subtipos de Influenza A y sus hospederos habituales	18
Figura 8. Distribución de 202 casos confirmados de Influenza A (H1N1) pdm09 en el Distrito Federal.....	23
Figura 9. Número de casos confirmados por laboratorio de la Influenza A (H1N1) pdm09 en México.....	24
Figura 10. Curva epidemiológica durante el brote de Influenza A (H1N1) pdm09 en México	25
Figura 11. Esquema del proceso del PCR en tiempo real	31

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Pag

Tabla 1. Estados más afectados de la República Mexicana durante las primeras 3 Oleadas de Influenza A (H1N1) pdm09	24
Tabla 2. Juego de iniciadores y sondas propuestos por el protocolo del CDC para la detección de Influenza A (H1N1) pdm09 por RT-PCR en tiempo real.....	38
Tabla 3. Juego de Iniciadores y sondas para la detección de Influenza A H1 estacional, H3 estacional y H5 por RT-PCR en tiempo real	39
Tabla 4. Reactivos usados en la técnica de RT-PCR en tiempo real	40
Tabla 5. Valores de Ct de las muestras subtipificadas por RT-PCR en tiempo real obtenidas de las muestras de Influenza A (H1N1) pdm09 de México	43
Tabla 6. Resultados de las muestras subtipificadas por RT-PCR en tiempo real, obtenidas de las muestras de Influenza A (H1N1) pdm09 de México	45
Gráfico 1. Porcentajes correspondientes a la subtipificación de la hemaglutinina en muestras de Influenza A (H1N1) pdm09 de México.	45

ABREVIATURAS

Å	Ångström (=1*10 ⁻¹⁰ m)
aa	Aminoácido.
a. C.	Antes de Cristo.
CDC	Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>).
cDNA	Ácido DesoxirriboNucléico complementario.
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades.
CP	Control Positivo.
Ct	Ciclo de umbral de detección (<i>threshold cycle</i>).
CD4	Cúmulo de Diferenciación 4 (<i>cluster of differentiation</i>).
CD8	Cúmulo de Diferenciación 8 (<i>cluster of differentiation</i>).
Da	Dalton.
dATP	DesoxiAdenina Trifosfatada.
dCTP	DesoxiCitocina Trifosfatada.
dGTP	DesoxiGuanina Trifosfatada.
DNA	Ácido DesoxirriboNucléico (<i>DesoxirriboNucleic Acid</i>).
dNTP	Desoxinucléotidos Trifosfatados.
dTTP	DesoxiTimina Trifosfatada.
ELISA	Ensayo de Inmuno Absorción Ligado a Enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>).
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
ER	Retículo Endoplásmico.
FDA	Administración de Drogas y Alimentos (<i>Food and Drugs Administration</i>).
HA	Hemaglutinina del virus de la Influenza A.
HA0/ H0	Precursor polipeptídico de la hemaglutinina del virus de la Influenza A.

H1	Hemaglutinina del virus de la Influenza A subtipo 1.
IFA	Ensayo de Inmunofluorescencia (<i>ImmunoFluorescence Assay</i>).
IL	Interleucina.
IMC	Inmunidad Mediada por Células.
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud.
INF	Interferón.
Inf A	Marcador molecular para la detección universal de Influenza A del gen que codifica la proteína M.
Influenza A (H1N1) pdm09	Virus Influenza tipo A subtipo H1N1 causante de la pandemia de 2009.
Influenza A TR (H3N2)	Virus de la Influenza tipo A subtipo H3N2 de Triple Reordenamiento de origen porcino surgido a finales de la década de los 90's.
Influenza A (H3N2)v	Virus de la Influenza tipo A subtipo H3N2 variante surgido en los años 2010 - 2011.
kDa	Kilodalton.
CTL	Linfocito T CD8 Citotóxico.
mM	Milimolar.
mRNA	Ácido Ribonucléico mensajero.
M1	Proteína de Matriz tipo 1.
M2	Proteína de Matriz tipo 2 (canal iónico).
NA	Neuraminidasa del virus de la Influenza A.
NEP	Proteína de Exportación Nuclear (<i>Nuclear Export Protein</i>).
NES	Señales de Exportación Nuclear (<i>Nuclear Export Signal</i>).
Célula NK	Célula Asesina Natural (<i>Natural Killer</i>).
NP	Proteína de cápside ó Nucleoproteína.
NS1	Proteína No Estructural tipo 1.
NS2	Proteína No Estructural tipo 2.

nt	Nucleótido.
ORF	Marco de Lectura Abierto (<i>Open Read Frame</i>).
PA	Proteína Ácida de la polimerasa.
PB1	Proteína Básica de la polimerasa tipo 1.
PB2	Proteína Básica de la polimerasa tipo 2.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PM	Peso Molecular.
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>RiboNucleic Acid</i>).
RNP	Ribonucleoproteína(s).
RP	RNAasa P humana.
RT-PCR	Retrotranscriptasa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
SSA	Secretaría de Salud.
ssRNA	RNA de cadena sencilla (<i>single strand RNA</i>).
swH1	Marcador molecular para la detección de la hemaglutinina tipo 1 de origen porcino (<i>swine HI</i>).
swInf A	Marcador molecular para la detección de Influenza tipo A de origen porcino en el gen NP (<i>swine Influenza A</i>).
TM	Transmembranal.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición e historia de la Influenza A

La “Influenza o gripe” es una enfermedad respiratoria causada por el virus de la familia *Orthomixoviridae* (*Orthos* “estándar, correcto” y *myxa* que significa “moco, mucosidad”), el cual se divide en 5 tipos: Influenza A, B, C, el género *Thogotovirus* y el género *Isavirus* (Talledo y Zumaeta, 2009). Los principales brotes de Influenza en los humanos se relacionan con el tipo A y B, sin embargo, son principalmente los virus de Influenza tipo A pertenecientes a los linajes humano, porcino, aviar, y sus subtipos derivados los causantes de grandes pandemias y epidemias estacionales humanas, tendiendo a variar constantemente con el tiempo circulando por todo el mundo a través de migraciones humanas y animales, favorecido por la globalización, pobreza, hacinamiento, conflictos sociales y cambio climático (Osoreo Plengue *et al*, 2009).

El significado de la palabra Influenza según algunas referencias tiene varios orígenes europeos que van del siglo XVI al XVIII, el más conocido y común es dado por el Papa Benedicto XIV el cual atribuye el término latín *influentia* porque se creía que las epidemias eran “influenciadas por las estrellas”, estrictamente es “influencia”, que significa acción o presión que ejerce una cosa sobre una persona o sobre otra cosa. También se sostiene que otro posible origen es la expresión de *influenza di freddo*, o sea, por la “influencia del frío”.

En Italia en el año 1742 se presentó un fuerte brote de catarro, al que se le denominó *influenza di catarro*, extendiéndose por toda Europa, y se le abrevió el nombre a “influenza”, que posteriormente es adoptado en una forma abreviada al inglés *flue* que para finales del siglo XIX se deriva simplemente en *flu*. También surge el término “gripe” del francés *grippe* cuyo significado es capricho o deseo repentino, ó también se le atribuye al franciscano “gripan” que significa “atrapar”. El primer registro de esta palabra en el español es el año 1895 en *Torquemada y San Pedro* de Benito Pérez Galdós (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009; Osoreo Plengue *et al*, 2009).

Desde tiempos antiguos se han hallado registros de epidemias con características clínicas de Influenza (tiempos de Hipócrates, 412 a. C.), también existen registros que datan de 1173 que han sido tomadas como las primeras descripciones probables de una epidemia de Influenza. La primera pandemia claramente registrada se originó en Asia Menor en el año de 1580, se extendió en aproximadamente seis semanas a África, Europa y América. Se presentó en dos oleadas, la primera en verano y la segunda en otoño, la mortalidad fue alta en Roma, murieron 9 000 personas, y en España todas las ciudades quedaron casi despobladas (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009; Osoro Plengue *et al*, 2009).

En los siguientes siglos, se reportaron importantes pandemias de Influenza en los años 1729, 1789, 1830 y 1889, ésta última del siglo XIX denominado Influenza asiática ó Influenza A H2N2 que dejó un estimado de 1 millón de muertos. En el siglo XX se presentaron 3 pandemias mucho más severas que las anteriores: 1918, Influenza A H1N1 ó gripe española, se habla de un rango de 20 - 100 millones de muertos; 1957, Influenza A H2N2 ó gripe asiática, con 1 - 1.5 millones de muertos; 1968, gripe de Hong Kong, con un saldo de 750 000 - 1 000 000 de muertos. En 1997 se registra una amenaza de pandemia con la llegada de la “gripe aviar”, en Hong Kong donde se reportaron 18 casos de los cuales 6 murieron y casos aislados en el Sur de China en 2003 y Países Bajos en 2004, el responsable es la cepa de Influenza A H5N1; 1999 se registraron dos casos de Influenza aviar H9N2 en Hong Kong.

En Marzo de 2009 se comienzan a registrar casos de una gripe atípica para la temporada de primavera en México y Estados Unidos, los estudios realizados al agente infeccioso confirman una nueva cepa de Influenza A H1N1 de origen porcino y el 11 de Junio de 2009 se declara la primera pandemia del siglo XXI. Para el 6 de Julio de 2009, se han confirmado 94 512 casos y 429 muertes en 120 países y sus diferentes territorios (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009).

1.2 El virus Influenza tipo A

El virus de la Influenza es una estructura esférica ó pleomórfica que tiene un diámetro aproximado de 80 a 120 nm; es un virus envuelto por una bicapa lipídica en la cual incorpora un número variable de proteínas, posee una proteína de matriz que le da la forma esférica y dentro de ella tiene un genoma de 8 segmentos independientes en forma de nucleoproteína asociados a un complejo enzimático para la replicación y transcripción (Figura 1) (Fauquet *et al*, 2005). De acuerdo a la clasificación de Baltimore, se encuentra en el grupo V: genoma compuesto de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa.

La composición de las partículas virales es de aproximadamente 1 % de RNA, 5 - 8 % de carbohidratos, 20 % de lípidos y 70 % de proteínas (Talledo y Zumaeta, 2009); son sensibles al calor, solventes lipídicos, detergentes no iónicos, formaldehído, radiaciones y agentes oxidantes (Fauquet *et al*, 2005).

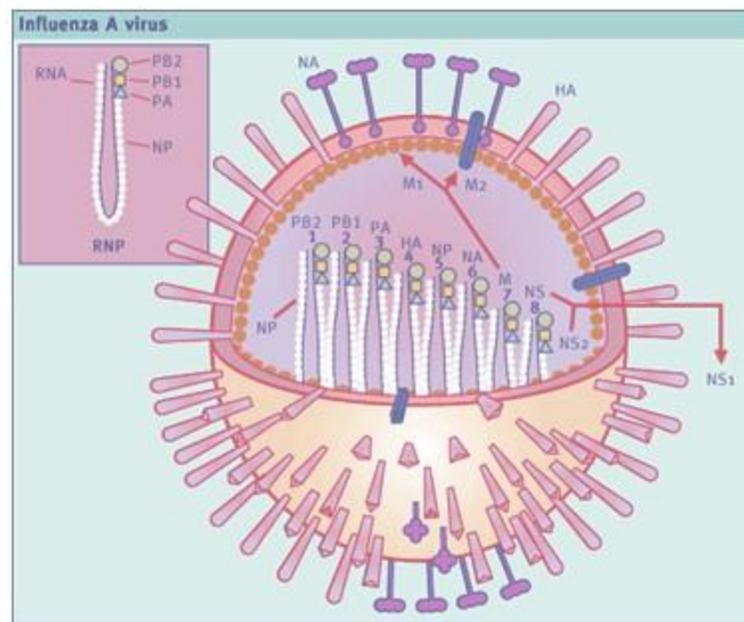


Figura 1. Estructura general del virus de la Influenza A. Se observan los 8 segmentos ribonucleoprotéicos asociados a polimerasas, la proteína de matriz, las proteínas superficiales: la Hemaglutinina, Neuraminidasa y la proteína M2. Las proteínas no estructurales (NS): la NS2 se encuentra asociado con la proteína de Matriz y la NS1 que sólo se encuentra en las células infectadas. Tomado de: Knipe *et al*, 2001.

1.2.1 Envoltura

Es una bicapa lipídica compuesta de colesterol, lípidos saturados y lípidos no saturados procedentes de la membrana citoplasmática de la célula respiratoria a partir de la cual se originó y constituye el 20 % de la composición total del virus (Zárate-Segura, 2010). En la misma se encuentran ancladas tres proteínas proyectadas radialmente hacia el exterior: la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y la proteína M2 que sirve como canal iónico. La envoltura es esencial para la viabilidad del virus, y aún con ella son virus muy susceptibles a la desecación ambiental, por eso su actividad infectiva no dura por largos periodos (McCaughey, 2010).

1.2.2 Genoma

El genoma del virus de la Influenza A consiste de 8 segmentos lineales de RNA de cadena única de polaridad negativa ($3' \rightarrow 5'$) (Figura 2). Si se toma en cuenta los 8 segmentos como si fuera uno solo tendría 13 588 a 13 600 nt, cada segmento codifica para una proteína, excepto los segmentos 2, 7 y 8 que codifican para dos, teniendo un total de 11 proteínas (Polo-Gamboa, 2009; Talledo y Zumaeta, 2009). La singular forma del genoma del virus de Influenza A hace que el virus adquiera nuevos subtipos antigénicos causantes de grandes pandemias ya que los segmentos pueden mezclarse al azar con segmentos de otros subtipos de Influenza A dentro de una misma célula presentándose el fenómeno de reordenamiento genético (McCaughey, 2010).

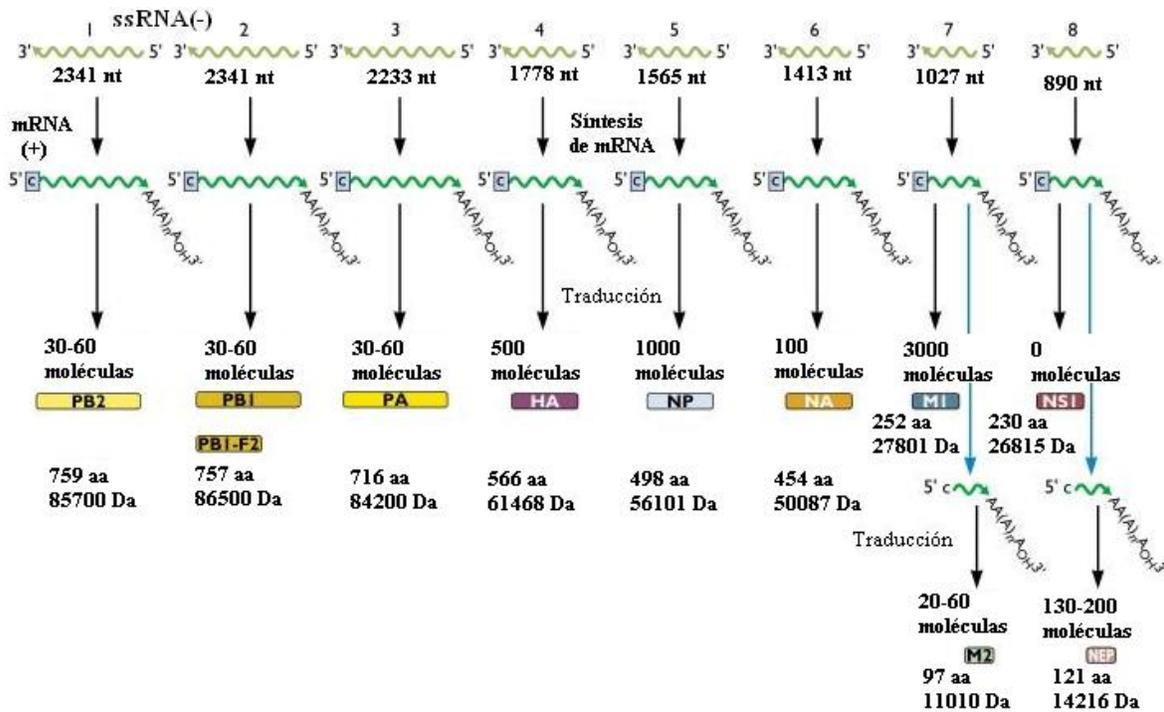


Figura 2. Estructura genómica de los virus de la Influenza A. Se muestran los ocho segmentos que conforman el genoma y la longitud de los mismos, así como el número de transcritos, longitud y peso molecular de las proteínas codificadas por cada uno. Modificado de: URL No. 4.

1.2.3 Nucleoproteína

Se encuentra asociado al genoma viral que en conjunto se le denomina ribonucleoproteína (RNP), una estructura con un PM de 56 101 Da y 498 aa, es codificada por el segmento 5 de 1 565 nt (Fauquet *et al*, 2005; Knipe *et al*, 2001). Su estructura tiene forma helicoidal y envuelve la columna vertebral de azúcar-fosfato del RNA, sin embargo éste no se encuentra dentro de la NP si no que este se encuentra en la parte externa rodeando a la NP, por lo que es sensible a RNAasas. Aproximadamente cada 20 nucleótidos interactúa una molécula de NP sin ninguna secuencia específica. Su función es presentar algunas bases del RNA de una manera accesible a las polimerasas para que estas puedan empezar la transcripción sin la necesidad de alterar la conformación de la RNP, también tiene la función de evitar paradas en los transcritos de las polimerasas (Baudin *et al*, 1994; Mendoza G, y Vielma A. 2009). La NP es uno de los antígenos específicos para distinguir entre los tipos de Influenza A, B y C (Knipe *et al*, 2001).

1.2.4 Polimerasa

Las polimerasas son un heterotrímero formado por las proteínas PB1, PB2 y PA; son codificados por los segmentos más largos de RNA, los segmentos 1 y 2 de 2341 nt, codifican la PB2 (de 87 kDa y 759 aa), PB1 (de 96 kDa y 757 aa) respectivamente y el segmento 3 de 2233 nt codifica para la PA (de 85 kDa y 716 aa) (Knipe *et al*, 2001). Se localizan a un costado de la RNP de cada segmento del RNA viral como un complejo unido por aproximadamente 2 monómeros de NP (Martín-Benito *et al*, 2001).

Las polimerasas son responsables de la replicación y transcripción del genoma viral dentro del núcleo celular donde: la PB1 tiene actividad polimerasa en la adición secuencial de nucleótidos utilizando un capuchón 5' metilado (13 - 15 nt) de los pre-RNA mensajeros celulares como iniciador (actividad endonucleasa). La PB2 tiene la actividad de unir el capuchón "robado" del mRNA celular con la molécula de mRNA viral. La PA actualmente no se le ha asociado una función específica, solo se ha reportado que tiene una relación en la replicación y transcripción (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009; Resa-Infante *et al*, 2011).

1.2.5 Proteína M1

La proteína de matriz o proteína M1 es codificada por el segmento 7 de 1027 nt junto con la proteína M2 y tiene un PM de 28 kDa. Es la estructura más abundante con unas 3 000 moléculas por partícula viral, su función es de darle rigidez a la envoltura, forma al virión, proteger a las RNP de los agentes externos y liberarlos hacía el citoplasma después del desnudamiento en su camino al núcleo celular. Se localiza justo debajo de la envoltura viral interactuando por un lado con los tallos de las glicoproteínas de superficie y por el otro con las RNP y la proteína NS2. Una sola mutación de la M1, puede producir la transformación de partículas filamentosas a partículas esféricas (Fauquet *et al*, 2005; Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009).

1.2.6 Proteína M2

Es una pequeña proteína integral de membrana que atraviesa de lado a lado a la bicapa lipídica, el segmento 7 de 1027 nt del genoma del virus tiene la información para codificar esta proteína la cual se ha observado que tiene un PM de 11 kDa y 97 aa (Fauquet *et al*, 2005).

La forma nativa de la proteína M2 es un homotetrámero que consiste en un par de dímeros enlazados por puentes disulfuro o tetrámeros enlazados por puentes disulfuro (Fauquet *et al*, 2005; Knipe *et al*, 2001), tiene tres dominios: en la orientación N-terminal que es la parte expuesta al exterior del virión, está compuesta por 24 residuos; la parte TM tiene 19 residuos y la orientación C-terminal, parte orientada hacia el citoplasma está compuesta por 54 residuos. Su presencia en la envoltura viral es muy escasa (alrededor de 20 - 60 moléculas por partícula viral) y no es fácilmente identificada mediante el microscopio electrónico. Su función es la de transportar protones a través de la membrana viral, reduciendo el pH en el interior del virión cuando éste se encuentra dentro de la vesícula para facilitar la disociación de las RNP de la proteína M1 preparándolo para el desnudamiento y equilibra el pH del lumen del aparato de Golgi con el del citoplasma para evitar que las hemaglutininas sintetizadas dentro de la célula no cambien de conformación durante su traslado hacia la superficie de ésta. Sólo los virus de Influenza tipo A tienen este tipo de proteína, característica importante para diferenciarlo de otros tipos de Ortomixovirus (Fauquet *et al*, 2005; Betakova, 2007).

1.2.7 Proteínas no estructurales

Son codificadas por el segmento 8, el más pequeño de todos con 890 nt, codifica la proteína NS1 de 27 kDa y la NS2 o NEP de 14 kDa (Knipe *et al*, 2001).

La proteína NS1 es expresada en grandes cantidades en las células infectadas, pero no ha sido detectada en los viriones, tiene una pequeña secuencia rica en residuos de leucina que media la exportación nuclear de proteínas, también es un excelente modulador de la respuesta inmune e interfiere con el procesamiento del mRNA del hospedero facilitando el procesamiento del mRNA viral. La proteína NS2 está asociada a la proteína M1 cuya función es la de guiar a las RNP hacia al núcleo después del desnudamiento por las señales de exportación nuclear (NES) que posee (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009; Luchsinger, 2009).

1.2.8 Hemaglutinina

Es la proteína más numerosa de las que se encuentran en la envoltura (entre 350 a 500 moléculas por partícula viral). Es codificada por el segmento 4 de 1 778 nt, sintetizada inicialmente en los ribosomas como un único precursor polipeptídico (HA0) de 562 a 566 aa (PM aproximadamente 76 kDa), por acción de proteasas intracelulares es procesado en dos subunidades: HA1 (PM cerca de 47 kDa) y HA2 (PM Cerca de 29 kDa), posteriormente es trasladado al lumen del ER y aparato de Golgi donde es glicosilada por más de 7 cadenas de oligosacáridos agregadas al hectodominio, y esterificada por tres residuos de palmitato vía enlace tioéter al extremo C-terminal en los residuos de cisteína (Knipe *et al*, 2001). Su estructura es un homotrímero cilíndrico de dos proteínas con uniones por puentes disulfuro de 135 Å de largo por 40 - 60 Å de diámetro (Figura 3-A), se divide en 3 zonas: un hectodominio de 512 residuos, un dominio TM de 27 residuos y un tallo citoplasmático de 10 residuos. La proteína madura reconoce al ácido siálico de la célula susceptible, para que el virus pueda ser endocitado y llevado dentro de una vesícula. La acidificación de la vesícula induce un cambio conformacional en la HA exponiendo regiones con mucha afinidad por la membrana de la vesícula, seguido por una fusión de ambas membranas y la liberación de las RNP del virus hacia el citoplasma de la célula infectada (Figura 3-B) (Betakova, 2007; Knipe *et al*, 2001).

Al estudiar cepas de virus aviares virulentas y apatógenas se encontró que el sitio de corte de la HA se encuentra en un bucle expuesto en el HA0; en partículas virales apatógenas, la HA contiene al menos dos aminoácidos básicos del tipo lisina y arginina en la región terminal de la HA1 adyacente al sitio de corte, de tal forma que la HA solo se corta por proteasas como la tripsina, que son secretadas en el tracto intestinal o respiratorio ó ambos sitios, de manera que sólo se producen infecciones localizadas, lo que resulta en una enfermedad leve o asintomática. En cambio, las cepas virulentas que presentan mutaciones puntuales generan sustituciones e inserciones de múltiples aminoácidos básicos (arginina y lisina) en el extremo carboxilo terminal de la HA1, permitiendo que proteasas celulares, tales como la furina (plasmina), enzima común en todo el cuerpo, reconozcan múltiples sitios con aminoácidos básicos capaces de procesar a la HA, lo que significa que la cepa tiene la posibilidad de infectar todo tipo de tejidos, lo que lleva a una infección sistémica (García García y Ramos, 2006; Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009).

En la naturaleza, hay por lo menos 16 diferentes subtipos de HA, solo los subtipos H1, H2 y H3 han sido reconocidos en virus capaces de transmitirse entre humanos y más reciente se han documentado casos de los subtipos H5, H7 y H9 (McCaughey, 2010).

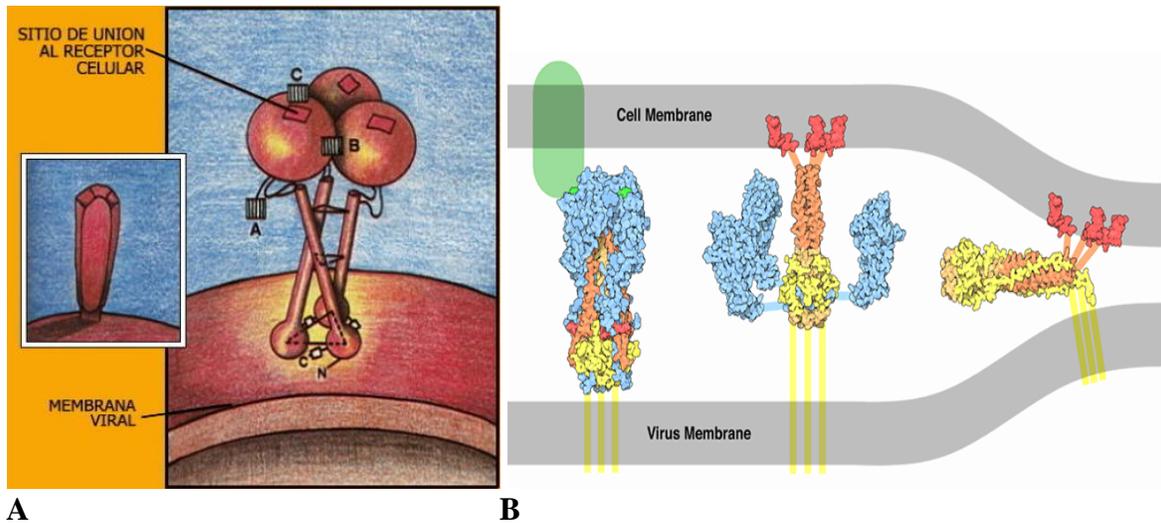


Figura 3. Hemaglutinina de los virus de Influenza tipo A. A: Representación gráfica de la HA se aprecian las tres subunidades de la proteína. B: Cambio conformacional de la HA dentro del endosoma. Se representan los tres cambios conformacionales de la proteína con el fin de fusionar la membrana viral con la del endosoma favoreciendo la liberación de las RNP hacia el citoplasma. Tomado de URL No.1.

1.2.9 Neuraminidasa

Es codificada por el segmento 6 de 1 413 nt, el cual codifica un polipéptido de 453 aa (PM cerca de 220 kDa). Tiene una estructura homotetramérica con actividad enzimática en la parte superior que hidroliza el ácido siálico entre la membrana celular y las partículas virales, también permite el transporte de las mismas a través de la capa de mucina presente en el tracto respiratorio lo que facilita su diseminación sobre las células epiteliales. Con respecto a la HA, la NA se encuentra en una proporción de 4:1 o 5:1 por virión, las dimensiones de diámetro y longitud son similares a la HA (Knipe *et al*, 2001; Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009).

1.3 Ciclo de Replicación

El proceso de replicación comienza con la entrada del virus al hospedero a través del tracto respiratorio. Al llegar a las células epiteliales, la HA del virus reconoce el receptor α -2,6 ácido siálico de la membrana plasmática; una vez unido receptor-contrareceptor, la partícula viral es transportada al citoplasma por medio de vesículas recubiertas con clatrina. Dentro del endosoma el pH ácido (pH 5) activa los canales iónicos virales que permiten la entrada de protones acidificando el interior del virus y preparándolo para su disociación (proteína M1 de las RNP), también la HA empieza a presentar cambios conformacionales y el rompimiento del precursor H0; una vez logrado presentar las características antes mencionadas la HA logra unir la membrana vacuolar con la membrana viral y se liberan finalmente las RNP. Éstas se dirigen al núcleo por medio de proteínas de localización nuclear y por la proteína NS2, donde se llevarán los procesos de replicación y transcripción. Posteriormente los mRNA virales salen del núcleo y se traducen. Las nuevas proteínas recién sintetizadas en los ribosomas (NP, PB2, PB1, PA, M1, y NS2) se dirigen al núcleo para unirse con las nuevas hebras de ssRNA (-) y ensamblarse.

Las proteínas HA y NA después de ser sintetizadas en el ER rugoso, son transportadas hacia la membrana celular vía aparato de Golgi incorporando en su tránsito carbohidratos a sus cadenas laterales, aquí también la proteína M2 se une a la membrana celular (Figura 4); finalmente salen por *budding* o “gemación” llevándose consigo una fracción de membrana celular y se liberan por la acción de la NA que hidroliza la unión del HA con los receptores de α -2,6 ácido siálico celulares evitando su aglomeración.

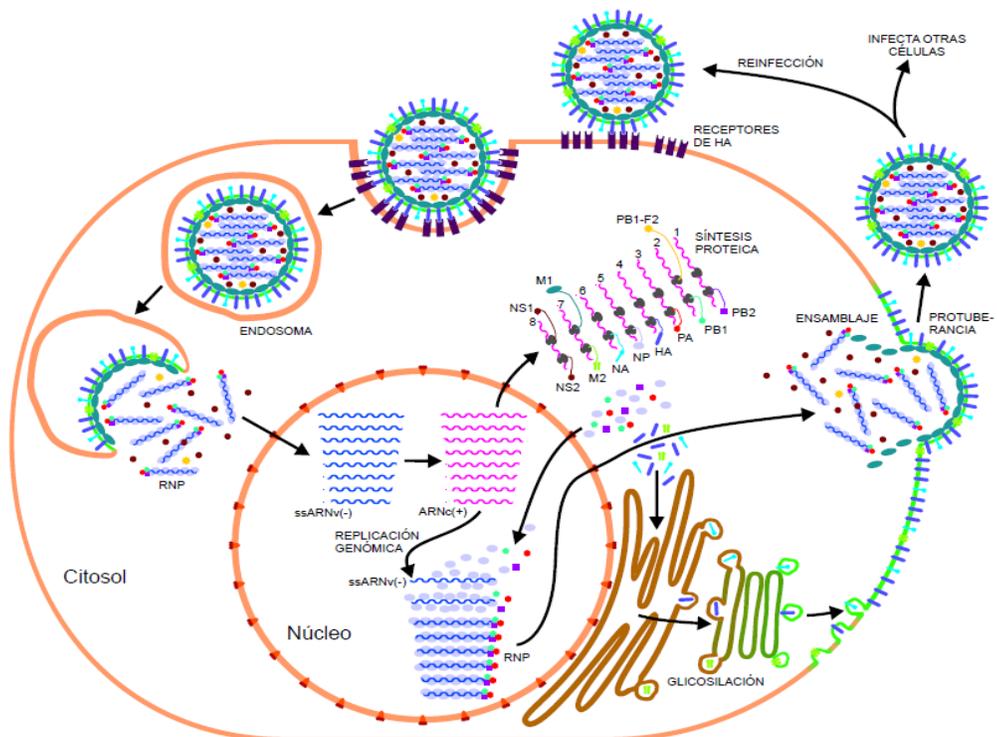


Figura 4. Esquema del proceso de replicación del virus de la Influenza. Tomado de: Polo-Gamboa *et al*, 2009.

1.4 Variación genética

Los virus de Influenza A son uno de los grupos virales que muestran el mayor número de mutaciones acumuladas a través del tiempo, fenómeno conocido como “deriva génica”, la cual es un proceso constante en los genomas de los virus de Influenza A y resulta en la selección de nuevas variantes virales. Debido a que la tasa de mutación es alta, sólo una mínima fracción de las copias son idénticas a las parenterales. Así, se genera en la progenie de este virus una gamma de genomas parecidos pero no clonales (idénticos), denominados *quasiespecies*. Debido a esto una buena porción de la progenie pueden ser partículas defectuosas y al paso de algunos años se extinguen tras acumular múltiples incompatibilidades con la funcionalidad de sus proteínas conocido como la “catástrofe del error”, mientras por otro lado una nueva variante apta a las condiciones predominantes se selecciona, incluyen la presión por las defensas del hospedero (Xicohtécatl-Palacios *et al*, 2009; McCaughey, 2010).

1.4.1 Derivado antigénico (*antigenic drift*)

Los cambios puntuales en algunas zonas de la HA y de la NA producto de las mutaciones se le denomina “derivado antigénico” (*antigenic drift*). Estas mutaciones se acumulan geográfica y temporalmente disminuyendo su similitud antigénica entre las antiguas y las nuevas cepas circulantes ocasionando brotes epidémicos locales (Luchsinger, 2009). De esta manera se explica que la evolución de los genes que codifican para las proteínas de superficie sea más rápida que en los genes de las proteínas internas (Mendoza G. y Vielma A., 2009).

La tasa de error que exhibe la RNA polimerasa es de 1×10^{-3} a 1×10^{-5} , es decir, introduce una mutación por cada 10 000 o 100 000 nucleótidos copiados, debido a su baja fidelidad de copiado, además se adiciona la incapacidad de corregir dichos errores (edición) por lo que las mutaciones se van acumulando en la secuencia, provocando cambios puntuales en las proteínas del virus (Xicohténcatl Palacios *et al*, 2009). La variación en la HA (H1) y NA ocurre en el orden de 4×10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio cada año (lo cual se traduce en una variación cercana al 1 % de la secuencia en aminoácidos de la HA en un año) (Mendoza G. y Vielma A., 2009), mientras la variación de la HA (específicamente en el dominio HA1) del subtipo H3 es 6.7×10^{-3} mutaciones por sitio cada año. Dichas mutaciones se pueden presentar como sustituciones de nucleótidos, inserciones o bien deleciones, las cuales ocurren también en cada uno de los ocho segmentos genómicos del virus.

La mayoría de las mutaciones ocurren en virus de Influenza de aves acuáticas permaneciendo silenciosas, es decir, no originan cambios en los aminoácidos codificados, sin embargo al transmitirse a otras especies, las mutaciones acumuladas generan cambios biológicos diferentes en la progenie viral, confiriéndole adaptación e infección en las especies diferentes, evasión al sistema inmune en especies habitualmente infectadas, la emergencia por la presión selectiva de variantes resistentes a los agentes antivirales o con tropismos celulares diferentes, todo lo anterior con la constante modificación en la patogénesis viral (Xicohténcatl Palacios *et al*, 2009).

1.4.2 Cambio antigénico (*antigenic shift*)

El reordenamiento genético (*genetic reassortment*) es la capacidad que tienen los segmentos de RNA de dos subtipos diferentes de Influenza de reordenarse entre sí durante el ensamble en una sola partícula viral dentro de una célula infectada para formar un nuevo subtipo de Influenza con propiedades antigénicas diferentes. Algunas de estas reasociaciones le pueden conferir al virus ventajas para infectar a otras especies, y en general sustituyen a alguno de los virus que le dieron origen, como ocurrió en las pandemias de 1957 y 1968 donde un número de segmentos genómicos se reordenaron con genomas de virus de origen no humano (Figura 5); a este proceso se le denomina “cambio antigénico” o *shift* (García-García y Ramos, 2006; Greenbaum *et al*, 2012).

El reordenamiento genético ha sido el verdadero causante de la aparición de los diferentes subtipos virales a lo largo de la historia conocida de los virus de Influenza en humanos y animales y de las diferentes pandemias que ha sufrido la humanidad, los animales inferiores y las aves. En principio, se piensa que el cambio antigénico ocurre cuando un virus de un ave silvestre infecta a un humano. No obstante, los virus de Influenza, al igual que la mayoría de virus, tienen un rango de hospedero limitado a individuos de la misma especie, lo que hace que ni siquiera pueda infectar a las aves de otras especies, menos aún a miembros de otras clases. Por lo tanto, el virus tiene que pasar obligadamente por un proceso de mutación progresiva antes de dar el salto a los humanos (Talledo y Zumaeta, 2009).

Por otra parte, estudios en la base de datos de secuencias y experimentos *in vitro* han demostrado que los reordenamientos genómicos entre cepas no ocurren de forma aleatoria. Al ser así se limita el número de reasociaciones funcionales posibles y se reduce el número de variantes virales potencialmente patógenas (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009). Cada tipo de cepa y el ambiente celular pueden influenciar en la recombinación, así que parecería imposible predecir si una nueva cepa pandémica puede formarse. Sin embargo no todas las recombinaciones pueden ocurrir o sobrevivir (Greenbaum *et al*, 2012). La alta frecuencia de reordenamiento es la característica de los virus de Influenza A, B y C pero no se ha encontrado indicios de que estos tres tipos reordenen sus genes (Knipe *et al*, 2001).

Si los virus generados por estos mecanismos poseen la capacidad de infectar humanos y de transmitirse entre ellos, tienen entonces un potencial pandémico, ya que la población humana mundial no posee ninguna inmunidad contra esta variante viral emergida en la naturaleza (Xicohténcatl-Palacios *et al*, 2009).

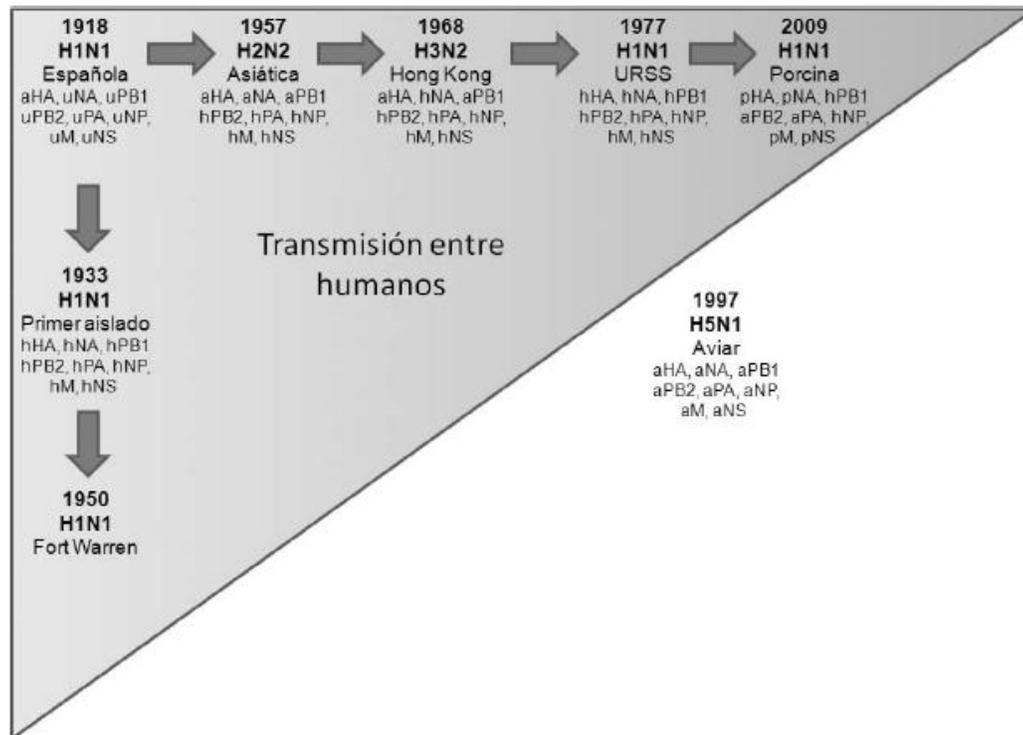


Figura 5. Variantes más importantes originadas por reasociaciones de segmentos genómicos que han afectado a humanos. El prefijo a indica que es de origen aviar, el h: humano, el p: porcino, y u: es de origen desconocido. Se indican los subtipos para HA y NA, así como el origen de cada segmento genómico para cada una de estas variantes y el año en que causó el brote. Tomado de: Xicohténcatl-Palacios *et al*, 2009.

1.5 Origen del virus Influenza A (H1N1) pdm09

El virus de la Influenza A (H1N1) pdm09 contiene una combinación de segmentos genómicos que no habían sido reportados en virus de Influenza de origen porcino o humano. Los segmentos genéticos NA y M son de la línea porcina de Eurasia (el gen NA proviene del virus de Influenza A (H1N1) Europeo aislado en 1991 - 1993 y el gen M proviene del virus de Influenza A (H3N2) aislado en Asia 1999 - 2000) todos ellos originalmente derivados totalmente de virus aviáres que entraron a poblaciones de cerdos Eurasiáticos en 1979 (Garten *et al.* 2009; McCaughey, 2010).

Los segmentos genéticos HA, NP y NS son de la línea porcina clásica. Se cree que los virus que surgieron de esta línea entraron en cerdos alrededor de 1918 y subsecuentemente circularon en virus porcinos clásicos y virus porcinos de triple reordenamiento. Los segmentos genéticos PB2 y PA son de la línea porcina de triple reordenamiento. Los virus que surgieron de esta línea, eran de origen aviar que entraron en cerdos de Norte América alrededor de 1998. Finalmente el segmento genómico PB1 es de la línea porcina de triple reordenamiento, que surgió de cerdos con origen humano al mismo tiempo que los virus porcinos de triple reordenamiento de Norte América, los mismos que surgieron de aves alrededor de 1968 (Figura 6) (Garten *et al.* 2009).

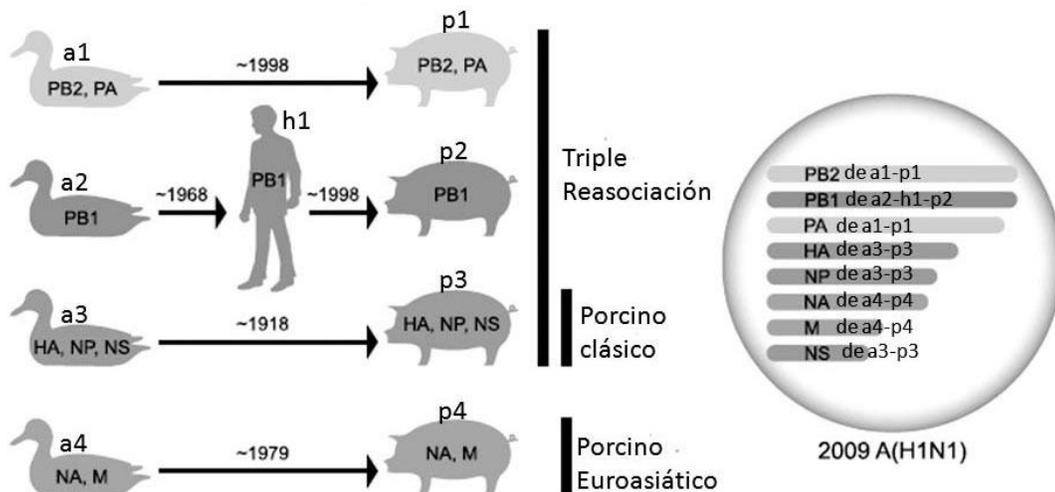


Figura 6. Diagrama del origen de la Influenza A (H1N1) pdm09 que surgió de la combinación de segmentos del virus de Influenza A de tipo aviar, humano y porcino. Tomado de: Xincóhténcatl Palacios, *et al.* 2009.

1.6 La primera pandemia del siglo XXI

El nuevo virus causó en la primavera de 2009 gran alarma en todo el mundo, registrándose los primeros casos en México y Estados Unidos. Al inicio de la contingencia en México, se creía de casos de Influenza estacional con evolución rápida a una neumonía grave; los primeros estados afectados fueron: Veracruz, México, San Luis Potosí, Oaxaca y Ciudad de México, por lo que el sector salud levanta una señal de contingencia pre-pandémica el 17 de Abril de 2009 contándose ya con 4 000 casos sospechosos, casos que fueron analizados por la Red Nacional de Laboratorios de México en colaboración con el CDC de Estados Unidos y los Laboratorios de Winnipeg de Canadá, identificándose al virus como Influenza A (H1N1) con origen desconocido.

Las medidas tomadas por el gobierno mexicano junto con la Secretaría de Salud consistieron en cancelar las actividades escolares en el Distrito Federal, el área metropolitana y en San Luis Potosí, y tres días después fueron implementadas en el resto del territorio nacional, además de la suspensión de toda actividad que implique reunión de personas, sin afectar los servicios estratégicos del país (Córdova-Villalobos *et al*, 2009).

Se determinó la secuencia genómica de la cepa (A/California/04/2009) y se denominó *swine* Influenza H1N1 (H1N1sw) ó Influenza porcina.

El 29 de Abril de 2009 la OMS declaró la fase 5, dando indicios de una posible pandemia y el 1 de Mayo se cambió la denominación de “Influenza porcina” a “Influenza H1N1”, ya que no se encontraron indicios de que esta epidemia proviniera de los cerdos (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009). Después de 17 días de contingencia, es levantada de forma gradual en todos los sectores del país al observar una disminución de casos registrados y al analizar el comportamiento del virus en la población (Córdova-Villalobos *et al*, 2009). El 11 de Junio de 2009 la OMS declara oficialmente la pandemia y cambia la alerta a fase 6, para ese entonces 74 países ya estaban afectados con 28 774 casos y 144 muertes (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009), y en Mayo de 2010 un total de 214 países fueron afectados con 18 097 muertes (Ramírez-González *et al*, 2011).

No se tiene claro si el lugar de inicio fue en México o en Estados Unidos ya que ambos países registraron un aumento en la transmisión de Influenza en los meses de Marzo - Abril (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009).

1.7 Reservorios

En base a su historia natural, los virus de Influenza A tienen como hospedero primario a las aves acuáticas silvestres (Talledo y Zumaeta, 2009), tanto de lagos como costeras, en particular las especies de las órdenes *Anseriforme* (patos), *Passeriforme* (gansos), ambas aves silvestres migratorias de lagos, y las del orden *Charadriiforme* (gaviotas y golondrinas marinas), que son aves acuáticas de las costas (García-García y Ramos, 2006). Los virus que atacan a la especie humana se unen preferentemente a los residuos por un enlace α -2,6 ácido siálico, presentes en forma predominante en las células epiteliales del tracto respiratorio del hombre, mientras que los virus que atacan a las aves tienden a unirse preferentemente por enlace α -2,3 ácido siálico que abundan en el epitelio intestinal de las mismas. Esta especificidad explica la dificultad de un determinado virus de Influenza para atravesar hacia otras especies. Sin embargo, en los epitelios de cerdos y de pollos están presentes tanto las conformaciones α -2,6 como las α -2,3, facilitando coinfecciones y reordenamientos genéticos que se traducen en la emergencia de nuevas variantes (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009).

En estudios filogenéticos y antigénicos en mamíferos marinos y semiacuáticos, los virus de Influenza parecen ser de origen aviar y probablemente resultan de la transmisión independiente desde aves acuáticas, por lo anterior es probable que todos los virus de Influenza A en mamíferos tengan enlaces de linajes aviares ancestrales (Figura 7) (Talledo y Zumaeta, 2009).

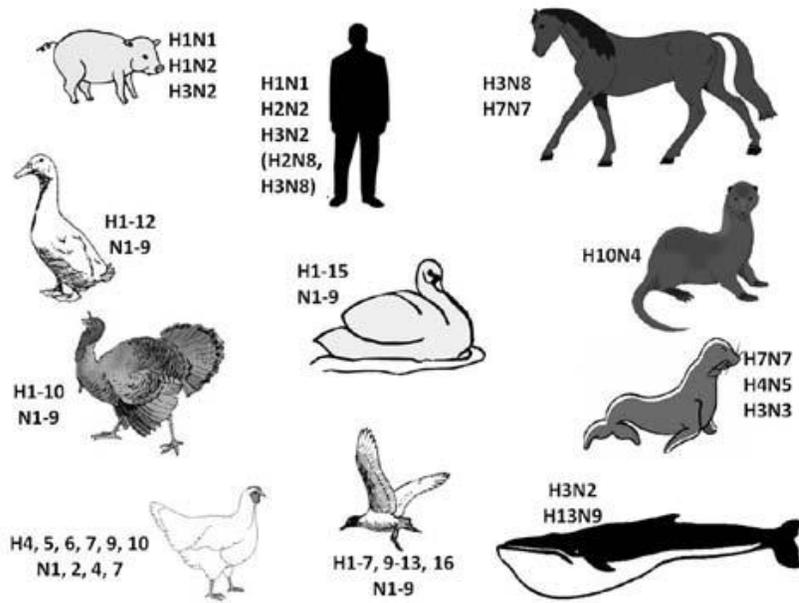


Figura 7. Los diferentes subtipos de Influenza A y sus hospederos habituales. Obsérvese que las aves acuáticas salvajes son portadoras de todos los subtipos del virus. Tomado de: Talledo y Zumaeta, 2009.

1.8 Modo de transmisión y enfermedad clínica

El virus se transmite por gotitas expelidas durante la tos y el estornudo, infectando las células epiteliales del tracto respiratorio superior. En el ser humano la multiplicación de los virus de Influenza parece estar restringida a las células epiteliales respiratorias. Los síntomas respiratorios se explican por la multiplicación del virus en la mucosa. Los síntomas sistémicos están causados por la llegada al torrente sanguíneo de los factores proinflamatorios que tienen efectos en los demás sistemas (Xicohténcatl Palacios *et al*, 2009). El periodo de incubación es de 1.5 - 3 días, el cual es similar a la Influenza estacional, en algunos pacientes el periodo se puede extender hasta los 7 días. El virus causa un amplio espectro de síndromes, que van desde enfermedad de vías respiratorias altas sin fiebre, hasta neumonía fulminante (Bautista *et al*, 2010).

Enfermedad leve sin fiebre ha sido reportada en 8 - 32 % de los pacientes. Síntomas gastrointestinales como: náusea, vómito y diarrea ocurren con más frecuencia que con la Influenza estacional, especialmente en adultos. Dolor de pecho, esputo purulento, fiebre recurrente o prolongada, estatus mental alterado, manifestaciones de deshidratación y reaparición de síntomas en el tracto respiratorio inferior después de una mejoría, son signos de progresión a una enfermedad más severa. El principal síndrome que conduce al hospital y a la unidad de cuidados intensivos es la difusión viral asociado con severa hipoxemia, Síndrome Agudo de Distrés Respiratorio, a veces shock y falla renal (49 – 72 %). El rápido progreso de la enfermedad es común 4 - 5 días después de la infección y la intubación comúnmente es necesaria dentro de las 24 horas después de ser ingresado al UCI. Otro síndrome incluye prolongada agudización de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma (14 – 15 %), coinfecciones bacterianas (20 – 24 %). Finalmente la muerte causada por el virus y coinfecciones bacterianas se ha registrado dentro de 2 - 3 días después de ingresar al UCI (26 – 38 %) (Bautista *et al*, 2010).

1.9 Respuesta inmune y patogenia

1.9.1 Características patológicas

La Influenza A H1N1 estacional al igual que la Influenza pandémica inducen daños muy similares que comprometen la salud del paciente si no recibe atención médica inmediata.

El virus se dirige principalmente contra las células epiteliales que recubren el lumen del tracto respiratorio y células productoras de moco por ser ricas en ácido siálico, en cuestión de horas son eliminadas por medio de la descamación dejando libre la capa basal donde no logra replicarse pero sigue invadiendo células vecinas. Al llegar a los bronquios sucede el mismo mecanismo de destrucción e infecta los neumocitos tipo 1 y 2, así como macrófagos intraalveolares, en esta etapa el organismo es susceptible ante cualquier patógeno oportunista que provoque una complicación (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*) (Talledo y Zumaeta, 2009; Bautista *et al*, 2010). El sistema inmune al tratar de eliminarlo llega a producir hiperreactividad bronquial, obstrucción de las vías aéreas y disminución en la capacidad de

difusión de gases, provocando la muerte al hospedero por asfixia. En una neumonía, se observa un ensanchamiento de las paredes alveolares, marcada hiperemia, infiltración de células mononucleares, dilatación capilar y trombosis. A nivel celular, la Influenza interrumpe la síntesis de proteínas e induce la apoptosis como una medida de destrucción celular, también puede ocurrir ruptura de paredes alveolares y bronquiales en casos extremos. Del tercer al quinto día después de presentarse la enfermedad, la mitosis comienza a aparecer en la capa basal iniciándose la recuperación del epitelio, sin embargo con el virus replicándose en el organismo, procesos de destrucción y reparación se van dando, tomando más de un mes al sistema de recuperarse de los daños, aún después de que el virus haya sido eliminado en su totalidad (Knipe *et al*, 2001).

1.9.2 Respuesta inmune del hospedero

La Influenza estacional y la pandémica inducen mediadores proinflamatorios similares en células animales *in vitro*, pero no activan efectivamente la respuesta antiviral en células dendríticas y macrófagos. Los mediadores proinflamatorios y activadores celulares varían según la etapa en que se encuentre la enfermedad en el paciente. Niveles incrementados de IL-15, IL-12p70, IL-8, y especialmente IL-6 pueden ser marcadores de una enfermedad crítica. Altos niveles de INF- γ y mediadores involucrados en el desarrollo de la respuesta de los Linfocitos T cooperadores tipo 1 y 17 han sido reportadas en pacientes hospitalizados. En pacientes que murieron o que sufrieron de Síndrome Agudo de Distrés Respiratorio se encontró incrementado en plasma IL-6, IL-10 e IL-15 durante la enfermedad, y factor estimulador de colonias de granulocitos; IL-1 α , IL-8, INF inductor de proteína-10 y TNF- α en la fase tardía de la enfermedad (Bautista *et al*, 2010).

La IMC está basada en respuesta de los linfocitos T CD4 cooperadores y los linfocitos T CD8 citotóxicos (CTL), los cuales aparecen a los 3 o 4 días de la infección y son de importancia clave para facilitar ambas respuestas (humoral y celular), y pueden generar citocinas citolíticas. Los CTL detectan y lisan células infectadas y su especificidad puede estar dirigida contra epítomos de HA, NP, M y PB2, también actúa reconociendo proteínas del nucleoide de la partícula viral, los cuales están más conservados que aquellos relacionados con la inmunidad humoral y pueden ser expresados por la célula infectada.

De manera adicional, la estimulación de células asesinas naturales (NK) es de vital importancia en la respuesta inmunitaria primaria, sobre todo por su capacidad para eliminar células infectadas sin la necesidad de encuentro previo con los antígenos, es decir de manera espontánea, y por su capacidad de secretar INF (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009). También se ha registrado resistencia al virus de manera local por medio de anticuerpos IgA e IgG en la zona de las mucosas del tracto respiratorio superior (Knipe *et al*, 2001).

1.10 Epidemiología

Los casos confirmados de Influenza A (H1N1) pdm09 correspondieron al 30 % de la población que presentó la sintomatología de la enfermedad tipo Influenza e infección respiratoria aguda. La confirmación de los casos fue a partir de la semana epidemiológica número 16 que corresponde a la tercera semana de Abril de 2009 (URL No. 13).

1.10.1 Morbilidad

La tasa de morbilidad en la edad de las personas oscilaba entre los 3 meses y los 70 años, donde los porcentajes de cada grupo son los siguientes: 32 % fueron de edades entre los 5 - 19 años, 28 % entre 20 - 39 años, 18 % entre 40 - 59 años y finalmente 3 % corresponde a personas de 60 años en adelante (Zepeda-López *et al*, 2010), según estudios mostraron que la población de esta edad presentaba anticuerpos contra la enfermedad, probablemente debido a infecciones pasadas o por la administración de vacunas (McCaughey, 2010).

Aproximadamente de una cuarta a la mitad de los pacientes infectados con el virus de la Influenza A (H1N1) pdm09 que fueron hospitalizados o que murieron no reportaron complicaciones médicas. Condiciones subyacentes que son asociados con complicaciones de Influenza estacional también son factores ante una infección por el virus de la Influenza pandémica.

Mujeres embarazadas (segundo o tercer trimestre), mujeres que tienen 2 semanas de haber dado a luz, y pacientes inmunodeprimidos o con desórdenes neurológicos, son los que sobresalen por presentar una infección severa por el nuevo virus de la Influenza. Las mujeres embarazadas representan solo el 1 a 2 % de la población entre los pacientes infectados, de igual manera se contaron por arriba del 7 a 10 % de los pacientes hospitalizados, 6 a 9 % de los pacientes que ingresaron al UCI y de 6 – 10 % de los pacientes que murieron.

Entre los pacientes que presentaron casos severos de infección o casos fatales se encuentran las personas con obesidad severa y mórbida obesidad, reportándose un factor de riesgo de 5 a 15 veces más que el rango de la población en general. En adición a riesgos relacionados con la obesidad, se encuentran enfermedades cardiovasculares y diabetes, problemas que posiblemente tienen efectos adversos inmunológicamente. También el problema relacionado con el manejo de la obesidad es otro factor que pudo haber contribuido.

Problemas sociales como la pobreza extrema principalmente a grupos indígenas (por la restricción a los sistemas de salud) aumenta el factor de riesgo en 5 a 7 veces. Factores que contribuyen más a este problema son: aglomeraciones de gente, incremento en la prevalencia de desórdenes médicos, alcoholismo, fumar y posibles factores genéticos de origen desconocido (Bautista *et al*, 2010).

1.10.2 Distribución de casos confirmados de Influenza A (H1N1) pdm09 en México

El 1 de Mayo de 2009, el Secretario de Salud mexicano reportó un gran número de casos confirmados de Influenza localizados principalmente en el Distrito Federal (57 % del total de casos) y el 5 de Mayo de 2009, se realizó un análisis demográfico registrando un aumento de casos de Influenza A (H1N1) pdm09 principalmente en las localidades del noreste del Distrito Federal con las siguientes cifras: Iztapalapa con 38 casos, Gustavo A. Madero con 28 casos, Iztacalco con 19 casos y Tláhuac con 19 casos, mientras en el suroeste de la ciudad se registró un bajo número de casos (Figura 8) (Zepeda-López *et al*, 2010).

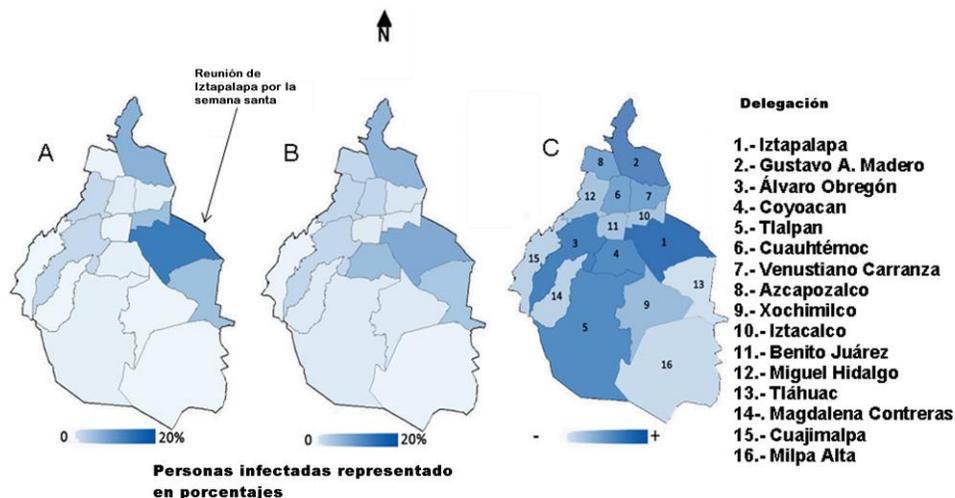


Figura 8. Distribución de 202 casos confirmados de Influenza A (H1N1) pdm09 en el Distrito Federal a inicios del brote en el año 2009. B. Distribución de 512 casos confirmados de Influenza A (H1N1) pdm09 por la secretaría de salud hasta el 5 de Mayo de 2009. C. Densidad de población en el Distrito Federal según el censo de población de 2005. Modificado de: Zepeda-López, *et al.* 2009

Entre los meses de Marzo a Diciembre de 2009, se reportaron 3 oleadas de la epidemia en México: la primera sucedió en los meses de Abril - Mayo donde los estados más afectados fueron: Ciudad de México, Jalisco, Tabasco, San Luis Potosí y Quintana Roo (Figura 9); la segunda oleada tuvo lugar en los meses de Junio - Julio donde los estados más afectados fueron: Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas, mientras que en la Ciudad de México disminuyó la cantidad de infectados. Finalmente la tercera oleada, entre los meses de Septiembre - Diciembre, el mayor número de casos fueron reportados aún en los estados de Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. En este punto la tasa de infectados en la Ciudad de México aumentó ligeramente. En la tabla 1 se reportan los estados más afectados de casos de Influenza A (H1N1) pdm09 por cada 100000 habitantes durante las tres oleadas (Figura 10).

Tabla 1. Estados más afectados de la República Mexicana durante las primeras 3 Oleadas de Influenza A (H1N1) pdm09

Estados más afectados	Número de casos reportados por cada 100000 habitantes		
	1ª Oleada	2ª Oleada	3ª Oleada
Ciudad de México	106.4	35.5	58.3
Jalisco	81.3	-----	-----
Tabasco	80.8	205	232.2
San Luis Potosí	65.6	-----	-----
Quintana Roo	42.4	262	347
Yucatán	-----	365	118.4
Chiapas	-----	105.3	-----

Las tasas de hospitalizaciones estimadas entre la primera y segunda oleada fueron 73/1 000 y 102/1 000 habitantes respectivamente, para la tercera oleada no se tienen datos registrados. En cuanto a las tres oleadas, la tasa de defunciones fue la siguiente: 0.18 %, 0.11 % y 1.88 % respectivamente. En la primera oleada se observa que la Ciudad de México encabezaba la lista de los lugares más afectados, pero de la segunda en adelante se observan los estados del sureste; como dicho fenómeno ocurrió en temporada de vacaciones, probablemente personas infectadas asintomáticas se trasladaron a los estados del sureste diseminando la enfermedad (Zepeda-López *et al*, 2010).

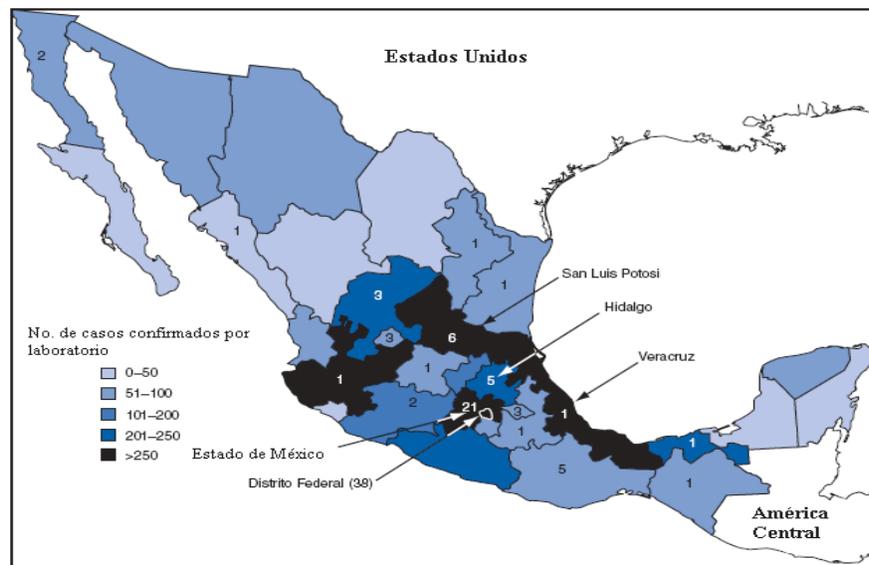
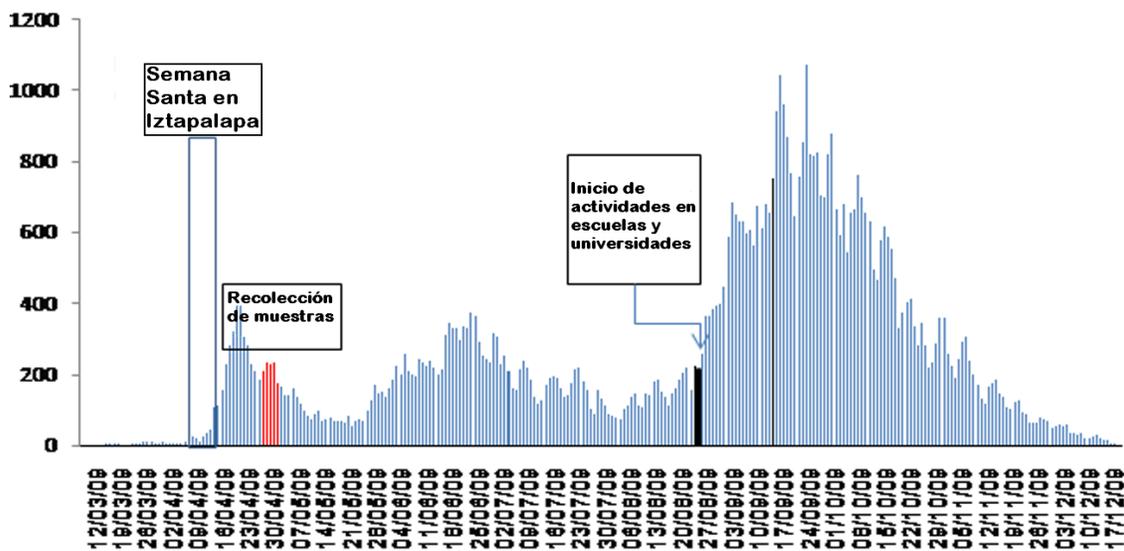


Figura 9. Número de casos confirmados por laboratorio de la Influenza A (H1N1) pdm09 (N=5,337) y muertes (N=97) por estado y en el Distrito Federal. Datos de Marzo a Mayo de 2009. Modificado de URL No. 12



Abril-Mayo
Junio-Julio
Septiembre-Diciembre

Figura 10. Curva epidemiológica durante el brote de Influenza A (H1N1) pdm09 en México, observándose tres oleadas: la primera registrada en los meses de Abril - Mayo, la segunda en los meses de Junio - Julio y la tercera en los meses de Septiembre - Diciembre. Se señalan las fechas de la Semana Santa en Iztapalapa, la recolección de muestras y el inicio de actividades después de la contingencia. Modificado de: Zepeda-López, *et al.* 2009.

1.11 Prevención y Tratamiento

1.11.1 Adamantanos

Son antivirales comúnmente usados para el tratamiento de la Influenza A. Esta recomendado para grupos de alto riesgo como son: personas que no se han vacunado, personal de hospital que está en contacto directo con los pacientes, personas que no presentan una neumonía severa o para aquellas que no tienen una complicada Influenza; tienen una efectividad del 70 – 90 % (Zárate Segura, 2010). El mecanismo de acción es dirigido contra la proteína M2 que es la causante de disminuir el pH dentro del virus y de la disociación de sus componentes en el citoplasma celular, también tiene un segundo efecto que es bloquear la maduración de la HA durante su transporte desde el ER hacia la membrana plasmática (Knipe *et al*, 2001; Intharathep *et al*, 2008). Cabe destacar que los adamantanos no son efectivos contra la Influenza B y C porque estos tipos no cuentan con proteína M2 (Knipe *et al*, 2001).

1.11.2 Inhibidores de la Neuraminidasa

Son una alternativa a los adamantanos. Su mecanismo de acción está dirigido contra el centro activo de la NA que bloquea la acción de la enzima evitando así la hidrólisis de las moléculas de ácido siálico con los receptores HA de los nuevos viriones quedándose en la membrana celular, siendo blanco de las células de defensa del hospedero. A diferencia de los adamantanos, los inhibidores de la neuraminidasa son efectivos contra el virus de la Influenza B. Zanamivir debe ser administrado intranasalmente o inhalado para un óptimo efecto y el Oseltamivir puede ser administrado vía oral (Knipe *et al*, 2001). En 2006 la empresa farmacéutica estadounidense BioCryst sacó a la venta el Peramivir un inhibidor de la neuraminidasa con mecanismo de acción similar al Zanamivir y Oseltamivir. Se administra vía intravenosa y tiene efecto rápido, es ideal para personas en estado crítico de salud (URL No. 3).

1.11.3 Otros antivirales contra la Influenza

La ribavirina, es un nucleósido análogo sintético que tiene actividad antiviral sobre los virus de Influenza A y B. La actividad antiviral sucede después de la adsorción, penetración y desnudamiento del virus para liberar su material genético. La efectividad de este fármaco es más marcada en animales y en cultivo celular, pero tiene un efecto terapéutico detectable si se administra por aerosol (Knipe *et al*, 2001).

1.11.4 Vacunas

Las vacunas son una opción para estar protegido contra la Influenza, puede venir en presentación triple (Influenza A H1N1/H3N2 e Influenza B) o monoviral (Influenza A H1N1) y se recomienda un refuerzo para aumentar la inmunidad. Son efectivas mientras no aparezca una nueva cepa de Influenza y la desventaja es que cada año se renueva la formulación para garantizar la protección contra las variantes del virus. Se recomienda la vacuna a cualquier edad, principalmente a personas con enfermedades crónicas (enfermedad cardíaca, enfermedad broncopulmonar, enfermedad renal, diabetes u otro desorden metabólico, mujeres embarazadas y niños que reciben largos tratamientos con aspirina); también es de prioridad vacunar a los adultos y a personas con alto riesgo de contagio (hospitalizadas) (Knipe *et al*, 2001).

Una vacuna experimental con virus vivos ha sido desarrollada para su uso en la inmunopprofilaxis de niños y adultos mostrando mayor resistencia contra la enfermedad, disminuye la morbilidad y mortalidad, aumenta la inmunidad local y teóricamente es un buen camino para estimular las células del sistema inmune (Knipe *et al*, 2001).

1.11.5 Resistencia de la Influenza a los medicamentos

Mutaciones en el genoma del virus, confieren resistencia a los antivirales que se usan para el tratamiento de la Influenza; estos casos fueron comúnmente presentados por personas a quienes se les administro el medicamento por largo periodo, a quienes les fallo el tratamiento, a personas inmunosuprimidas, también a personas que reciben el tratamiento por primera vez y aquellas que se encuentran en hospitales.

La mutación más común en los aislamientos es la H275Y presente en la NA, que confiere resistencia al Oseltamivir y al Peramivir en un 80 % (Bautista *et al*, 2010), también la mutación S31N presente en la proteína M1, resistente a los adamantanos sin influir en su grado de virulencia (Weinstock and Zuccotti, 2009); aparte, un menor número de otras mutaciones a los inhibidores de la NA en los virus de Influenza A (H1N1) pdm09 han sido detectados: I117M, I117V, S247N, I223V e I223R. Actualmente se ha encontrado una mutación combinada H275Y + I117M aunque su resistencia es muy similar a la mutación H275Y y por experimentación se creó la mutación H275Y + I117V que es tres veces más resistente al Oseltamivir y dos veces al Peramivir con respecto a la mutación H275Y (Hurt *et al*, 2012).

1.12 Diagnóstico

Las muestras de elección son: aspirado nasofaríngeo en los niños y lavado nasal en adultos, por la mayor concentración de virus que en ellas se presenta. Asimismo el rendimiento viral es mayor si la muestra se obtiene en los primeros cuatro días de la enfermedad y su traslado al laboratorio se realiza en corto tiempo, en medio de transporte viral y en frío para preservar la partícula viral o su genoma. Tanto para fines clínicos como epidemiológicos el diagnóstico del virus de la Influenza se puede realizar mediante la detección del agente o de la respuesta inmune contra el mismo (Luchsinger, 2009).

1.12.1 Aislamiento viral

El aislamiento viral se realiza en embriones de pollo de 9 - 11 días de edad, es el sistema de elección para la elaboración de vacunas y el estándar de oro para el diagnóstico de Influenza aviar. Para el aislamiento de Influenza A y B de origen humano y porcino (tipo A) son usadas las líneas celulares como las de riñón canino de Madin-Darby (MDCK), las células de riñón de mono verde (VERO) y con menor frecuencia las células de riñón de hámster, gallina y becerro; fibroblastos de embrión de pollo y células epiteliales humanas. La ventaja de éste método es que se puede obtener el virus de cualquier muestra, la desventaja es su baja especificidad, ya que no distingue entre virus con características similares como los Paramixovirus, también se requiere de largo tiempo para generar el material viral (hasta 3 semanas) dependiendo de la muestra y concentración inicial del virus y, para virus altamente patógenos se necesita trabajar en laboratorios de nivel 3 (para Influenza aviar) (Xicohtécatl-Palacios *et al*, 2009; Luchsinger, 2009).

1.12.2 Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos se basan en la detección del antígeno viral o anticuerpos del hospedero; técnicas como ELISA, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación e IFA presentan una sensibilidad del 70 % y especificidad del 90 % con respecto al aislamiento viral (Luchsinger, 2009). El tiempo de ejecución es favorable para un diagnóstico rápido y su desventaja es que solamente detectan entre tipos de Influenza A, B y C ó A y B juntos y para la detección de subtipos aumenta el costo por la necesidad de adquirir anticuerpos específicos (16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA) presentándose en algunos casos reacciones cruzadas por interacciones estéricas de la HA y NA. En el caso del IFA se necesita de personal con experiencia para detectar los falsos positivos frente al microscopio de fluorescencia y la mayor desventaja es la sensibilidad y tiempo de ejecución porque las muestras se deben de tomar bajo ciertos procesos normalizados dependiendo de la etapa de infección en que se encuentre (Xicohtécatl-Palacios *et al*, 2009).

1.12.3 Métodos moleculares

El diagnóstico molecular es actualmente el método de elección para la detección y caracterización del nuevo virus de la Influenza A (H1N1) pdm09. Consiste en la detección del genoma viral (RNA) directamente de muestras clínicas o del cultivo celular (URL No. 2).

1.13 La tecnología del PCR

1.13.1 Fundamento del PCR

El principio fundamental del PCR es la amplificación de un fragmento específico de DNA a través de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial, hasta acumular el suficiente producto para ser visualizado. De esta manera, una simple molécula puede generar más de mil millones de copias de sí misma después de 30 ciclos de replicación exponencial.

Cada ciclo de amplificación típicamente consiste de tres etapas a diferentes temperaturas, en la cual la mezcla de ingredientes de la reacción de PCR se someten a diferentes procesos físicos y bioquímicos (desnaturalización, alineamiento y extensión) para que la plantilla de DNA sea replicado. El primer paso es una incubación a 94 °C que permite la desnaturalización de las dos cadenas de la plantilla de DNA. Esto es seguido por un alineamiento a 54 °C, paso que permite la hibridación de los iniciadores con su secuencia complementaria en el DNA blanco. Finalmente, el ciclo es completado durante una extensión, paso a 72 °C cuando la polimerasa se extiende del iniciador en la dirección 5´ a 3´ replicando la cadena de la plantilla. Una amplificación estándar consiste entre 25 a 35 ciclos (Harris, 1998).

1.13.2 RT-PCR en tiempo real

El acoplamiento de una fase de retrotranscripción al PCR (RT-PCR) permite identificar moléculas de RNA que conforman el genoma de múltiples agentes infecciosos. El RT-PCR en tiempo real combina las ventajas y el formato del RT-PCR de punto final, con un sistema espectrofotométrico que detecta la fluorescencia como producto de la reacción enzimática en el mismo momento que se están generando las nuevas hebras de DNA (Xicohtécatl Palacios *et al*, 2009).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en el RT-PCR de tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Costa, 2004).

Agentes intercalantes: Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al DNA de doble hélice. El más empleado es el SYBR Green I. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR.

Sondas de hibridación específica: Son oligonucleótidos marcados con dos tipos de moléculas, un donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas, para que esto ocurra, las moléculas donador y aceptor deben estar espacialmente próximas.

La emisión de fluorescencia es dada por la hidrólisis de la sonda por la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa, produciéndose la liberación del fluorocromo donador, como donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 11). Las sondas de hidrólisis más utilizadas son las denominadas sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET (Costa, 2004).

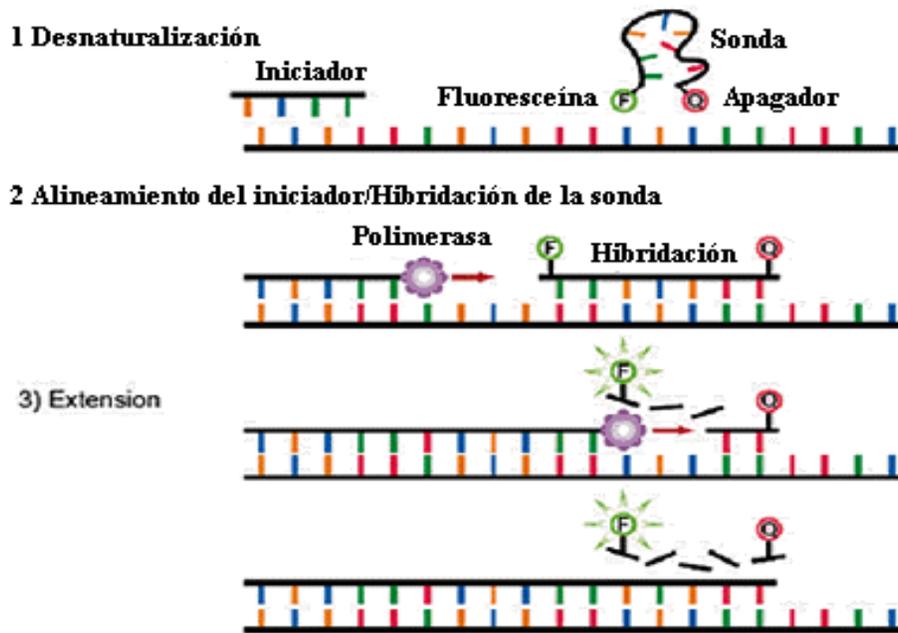


Figura 11. Esquema del proceso del PCR en tiempo real. En la primera etapa se observa la unión del iniciador con su secuencia complementaria así como de la sonda. En la segunda etapa, la síntesis de las nuevas cadenas de DNA por parte de la *Taq* polimerasa. La tercera etapa la extensión de la cadena y la hidrólisis de la sonda. Modificado de URL No. 9.

1.13.3 Cinética de amplificación en una PCR

En el proceso de amplificación, se distinguen tres fases: geométrica, lineal y estacionaria.

Fase Geométrica: Durante esta fase todos los reactivos se encuentran en abundancia; en esta etapa la eficiencia de amplificación es cercana al 100 %, donde la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se generan dos moléculas de DNA.

Fase Lineal: Los iniciadores, dNTP's y/o enzima comienzan a ser factores limitantes, además de la generación de pirofosfato y el decaimiento de la actividad enzimática que afectan la eficiencia de la amplificación de manera constante, por lo que no es posible realizar un ensayo cuantitativo en esta parte.

Fase Estacionaria: En este punto se detiene la amplificación, la cantidad de producto es constante sin importar cuantos ciclos se prolongue la reacción (URL No. 6).

El umbral de detección se establece basándose en la fluorescencia de fondo y equivale a 10 veces la desviación estándar de la media de emisión de la línea basal. Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar a este umbral de detección, se le conoce como Ct (threshold cycle o ciclo de umbral de detección). De esta forma, el Ct es un número que indica cuantos ciclos le tomo a cada muestra generar cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección (URL No. 6).

1.13.4 Diagnóstico de Influenza A (H1N1) pdm09 por RT-PCR en tiempo real, Protocolo del CDC

El ensayo de RT-PCR en tiempo real es el método de referencia para el diagnóstico de Influenza A (H1N1) pdm09 por la sensibilidad y especificidad en muestras clínicas, también ahorra tiempo y es más específico que el PCR de punto final. Por lo tanto el ensayo del RT-PCR en tiempo real ha sido usado y recomendado por la OMS por la rapidez en la detección del virus (Kang *et al*, 2010) mediante el protocolo diseñado y validado por el CDC (versión 2009). Este ensayo fue autorizado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado en la detección del genoma viral en muestras respiratorias de pacientes que puedan estar infectados con el nuevo virus de la Influenza A; aclara la FDA que se autoriza al CDC a usar este ensayo y a distribuirlo a laboratorios de salud pública del mundo y de la Red de Influenza, pero que no se autoriza el uso comercial del mismo (URL No. 2).

Principios del ensayo: Este ensayo puede detectar la presencia del genoma del virus de la Influenza A de origen humano o porcino y diferenciar entre Influenza A humana o porcina, y entre las cepas porcinas detectar específicamente al nuevo virus.

Muestras: El ensayo de RT-PCR en tiempo real para el nuevo virus Influenza A amplifica el genoma viral en muestras respiratorias o bien a partir de material de cultivo viral (URL No. 5).

Reactivos: Este ensayo consiste en un panel de iniciadores y de sondas fluorescentes doblemente marcadas, con tecnología Taqman®:

- 1.- Un par de iniciadores y una sonda fluorescente Inf A diseñados para la detección universal del virus Influenza A, que amplifica el gen de la proteína M en todos los virus de cualquier especie.

- 2.- Un par de iniciadores y una sonda fluorescente swInf A diseñados para la detección del gen de la NP de todos los virus de Influenza A de origen porcino.
- 3.- El conjunto swH1 comprende el par de iniciadores y una sonda fluorescente con capacidad para detectar específicamente la Hemaglutinina tipo 1 (H1) del virus Influenza A (H1N1) de origen porcino.
- 4.- Un par de iniciadores y una sonda fluorescente para detectar específicamente el gen de la RNasa P (RP) humana. Este es un control que permite estimar si la cantidad de RNA en la muestra es adecuada.
- 5.- Un control positivo (CP), es una plantilla diseñada para reaccionar con todos los iniciadores y sondas incluido los de la RNasa P (URL No. 5).

2. JUSTIFICACIÓN

La Influenza A, enfermedad común en el ser humano tiene su máxima actividad en las estaciones de Otoño-Invierno, sin embargo cuando aparece de manera atípica en cualquier época del año causa grandes epidemias.

El virus tiende a cambiar constantemente en la secuencia de bases provocando brotes estacionales severos todos los años en las épocas de frío. Estos cambios son más sobresalientes en la HA y en menor grado en la NA puesto que son las proteínas que están en contacto constante con el sistema inmune del hospedero. Sumado a lo anterior, como es un virus de arreglo genético segmentado, la probabilidad de reordenamientos con otros subtipos virales de Influenza es alta, convirtiéndolo en un virus para el cual la población no tiene protección inmunológica generando altas tasas de morbilidad y mortalidad, y como consecuencia casusa estragos en el sector salud: como escasez de medicamentos, falta de personal de salud capacitado en atención al paciente y ayuda por parte de instituciones internacionales, tal como sucedió en la pandemia de 2009.

Debido a tal dinamismo en cambiar su material genético ya sea por cambios en la secuencia nucleotídica (*drifts*) o por cambios completos de sus segmentos (*shifts*), en este trabajo las posibles variantes nucleotídicas en algunas muestras positivas a Influenza A (H1N1) pdm09 podrían estar presentes en el fragmento del gen de la HA debido a que los iniciadores o sonda usados en la técnica de RT-PCR en tiempo real no se unieron a su secuencia blanco puesto que no se observaron gráficas de amplificación de durante el ensayo, indicio de que dicha aseveración sea verdadera por lo que puede existir alguna mutación en la secuencia nucleotídica que pueda llevar a una modificación en la secuencia de aminoácidos de la HA.

3. OBJETIVOS

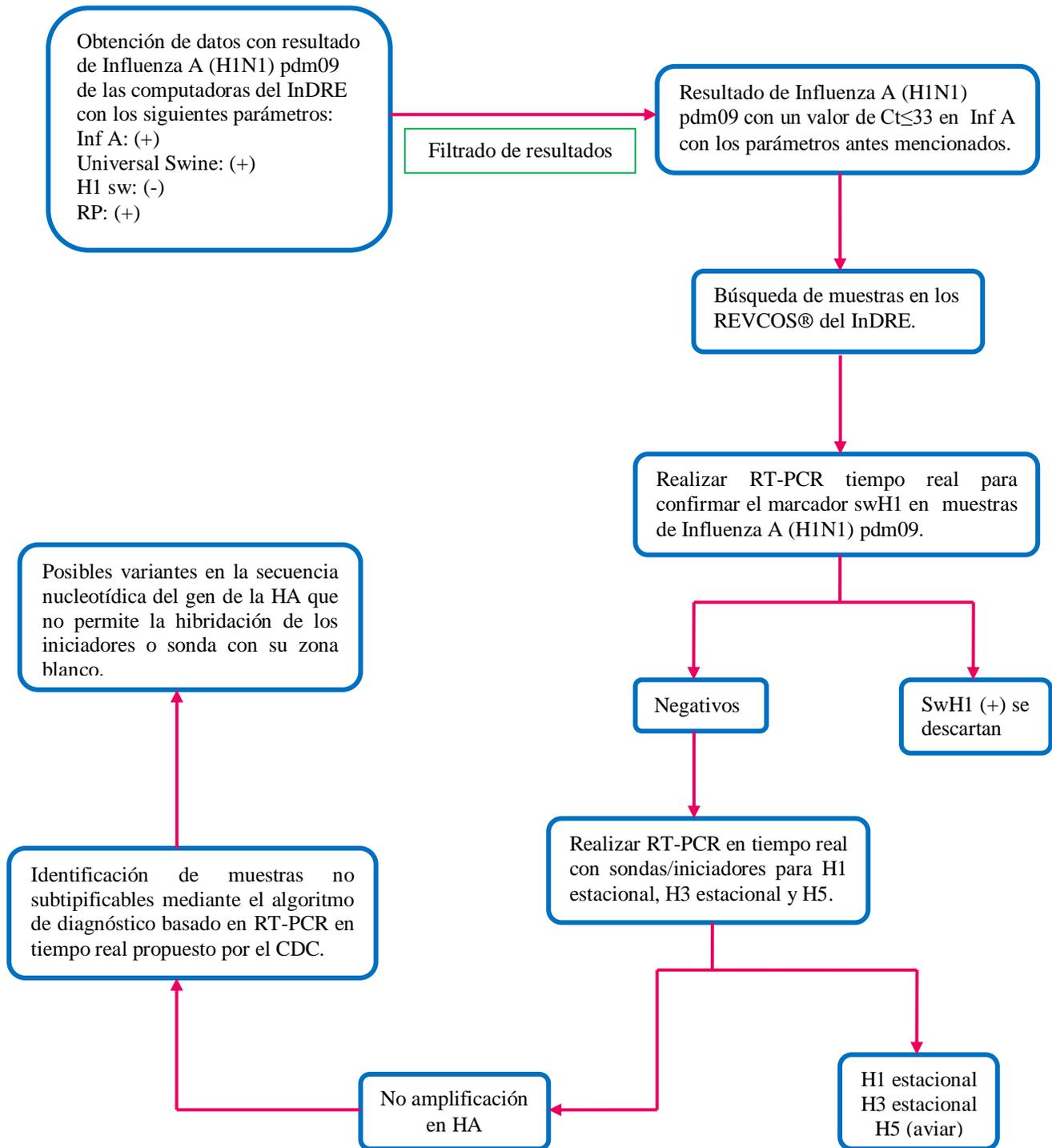
3.1 Objetivo General

- Buscar posibles variantes genéticas en un fragmento del gen de la HA en muestras de Influenza A (H1N1) pandémico por la técnica de RT-PCR en tiempo real que indique la probabilidad de que dichos cambios influyan en una mutación puntual de la HA.

3.2 Objetivos Particulares

- Realizar la búsqueda de muestras positivas a Influenza A H1N1 pandémico en las que no se pudo determinar la presencia de HA de origen porcino.
- Seleccionar aquellas muestras de Influenza A (H1N1) pandémico con cantidad adecuada de material genético.
- Determinar el subtipo de HA viral presente en las muestras de Influenza A (H1N1) pandémico.

4. DIAGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Selección de muestras

- Para obtener las muestras adecuadas en el análisis molecular, se procedió en ir a las computadoras del InDRE donde se tienen guardados en una base de datos los resultados obtenidos durante la pandemia de los años 2009 a 2011.
- Las muestras de interés son las que presentan el siguiente patrón de amplificación: Inf A (+), Universal Swine (+), H1 sw (-) y RP (+)
- De los datos obtenidos con los parámetros antes mencionados, se realizó un análisis minucioso para obtener aquellos con un Ct adecuado ($Ct \leq 33$) que garantice la viabilidad de los ácidos nucleicos para el análisis molecular.
- Se procedió a la búsqueda física en los congeladores REVCO® del InDRE conservados en tubos Eppendorf® de 1.0 mL a -70°C de acuerdo a la lista final obtenida de las muestras; estas muestras fueron obtenidas a partir de pacientes hospitalizados y de clínicas provenientes de todo el país con sospecha de Influenza A H1N1 pandémico del año 2009 y 2010.

5.2 Subtipificación de la HA

- Las muestras seleccionadas que presentaron el resultado negativo en el parámetro H1 swine durante el diagnóstico en la pandemia de los años 2009 y 2010 fueron de nuevo sometidas a análisis para confirmar la presencia de la HA de origen porcino usando los marcadores moleculares presentados en la tabla 2 para su detección.
- Las muestras que presentaron nuevamente ausencia de amplificación de la HA de origen porcino se subtipificaron con el uso de iniciadores y sondas para los subtipos H1 estacional, H3 estacional y H5, esto como parte de la batería de iniciadores y sondas usados para el diagnóstico de Influenza estacional y para la detección de Influenza aviar de alta patogenicidad que se encuentran en la tabla 3.

- En cada subtipo a identificar se introdujeron controles positivos y negativos para verificar el correcto funcionamiento de la técnica.
- La identificación de muestras de Influenza A H1 estacional, H3 estacional y H5 por RT-PCR en tiempo real se realizó conforme al protocolo del CDC para la identificación de la Influenza A (H1N1) pdm09, diferenciándose solo en el uso de los diferentes marcadores moleculares para cada subtipo de Influenza antes mencionado.

Tabla 2. Juego de iniciadores y sondas propuestos por el protocolo del CDC para la detección de Influenza A (H1N1) pdm09 por RT-PCR en tiempo real

Iniciadores/ Sondas	Secuencia (5' > 3')	Concentración de Trabajo
Inf A Fw	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 μM
Inf A Rv	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 μM
Sonda Inf A ¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 μM
SwInf A Fw	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 μM
SwInf A Rv	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 μM
Sonda SwInf A ²	CYA CTG CAA GCC CA"TT" ACA CAC AAG CAG GCA	10 μM
SwH1 Fw	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 μM
SwH1 Rv	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 μM
Sonda SwH1 ²	CA GAA TAT ACA "T"CC RGT CAC AAT TGG ARA A	10 μM
RNasa P Fw	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	40 μM
RNasa P Rv	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	40 μM
Sonda RNasa P ¹	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	10 μM

¹ Las sondas TaqMan® son marcadas en el extremo 5' con una molécula reportera 6-carboxifluoresceína (FAM) y con el apagador, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) en el extremo 3'.

² Las sondas TaqMan® son marcadas en el extremo 5' con una molécula reportera 6-carboxifluoresceína (FAM) y apaga internamente en un residuo "T" modificado con BHQ1, con su extremo 3' modificado para prevenir la extensión de la sonda por la Taq polimerasa.

Tabla 3. Juego de Iniciadores y sondas para la detección de Influenza A H1 estacional, H3 estacional y H5 por RT-PCR en tiempo real

Iniciadores/Sondas	Secuencia (5' > 3')	Concentración de Trabajo
H1 estacional Fw	AAC TAC TAC TGG ACT CTR CTK GAA	40 µM
H1 estacional Rv	CCA TTG GTG CAT TTG AGK TGA TG	40 µM
Sonda H1 estacional ²	TGA YCC AAA GCC TCT ACT CAG TGC GAA AGC	10 µM
H3 estacional Fw	AAG CAT TCC YAA TGA CAA ACC	40 µM
H3 estacional Rv	ATT GCR CCR AAT ATG CCT CTA GT	40 µM
Sonda H3 estacional ¹	CAG GAT CAC ATA TGG GSC CTG TCC CAG	10 µM
H5 Fw	TGG AAA GTR TAA RAA ACG GAA CGT	40 µM
H5 Rv	YGC TAG GGA RCT CGC CAC TG	40 µM
Sonda-1 H5 ²	TGA CTA CCC GCA GTA TTC AGA AGA AGC AAG ACT AA	10 µM
Sonda-2 H5 ²	CAA CTA TCC GCA GTA TTC AGA AGA AGC AAG ATT AA	10 µM

¹ Las sondas TaqMan® son marcadas en el extremo 5' con una molécula reportera 6-carboxifluoresceína (FAM) y con el apagador, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) en el extremo 3'.

² Las sondas TaqMan® son marcadas en el extremo 5' con una molécula reportera 6-carboxifluoresceína (FAM) y apaga internamente en un residuo "T" modificado con BHQ1, con su extremo 3' modificado para prevenir la extensión de la sonda por la Taq polimerasa.

5.3 Preparación de la mezcla de reacción

- Para la mezcla de reacción se usaron los iniciadores y sondas indicadas en la tabla 2 y tabla 3, el estuche comercial SuperScript™III Platinum® One-Step Quantitative (Invitrogen, EU) en el 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, EU).
- Se prepara la mezcla de reacción en un tubo Eppendorf® de mayor volumen (1.5 mL) adecuado para el número de muestras a analizar. Los volúmenes de cada componente se indican en la tabla 4. La mezcla se deposita en una microplaca de 96 pozos, colocando en cada pozo 20 µL de mezcla, a la que posteriormente se adicionan 5 µL de extracto de ácido nucléico de cada muestra.
- Para cada marcador se realiza una mezcla de reacción.

Tabla 4. Reactivos usados en la técnica de RT-PCR en tiempo real

Reactivo	Volumen de reactivo agregado por reacción
Agua libre de nucleasas	N x 5.5 µL
Iniciador Fw	N x 0.5 µL
Iniciador Rv	N x 0.5 µL
Sonda	N x 0.5 µL
Enzima (SuperScript™ III RT/Platinum® <i>Taq</i> Mix)	N x 0.5 µL
Buffer (2X PCR Master Mix)	N x 12.5 µL
Volumen Total	N x 20.0 µL

N= Número de muestras

- Las condiciones de reacción se indican a continuación:

Transcripción reversa	50 °C por 30 minutos
Activación de la <i>Taq</i> polimerasa	95 °C por 2 minutos
Amplificación del PCR (45 ciclos)	95 °C por 15 segundos 55 °C por 30 segundos*

6. RESULTADOS

Se identificaron 1 138 resultados positivos al virus de la Influenza A (H1N1) pdm09 que no presentaban amplificación de la HA de origen porcino, de las cuáles se realizó un primer filtro porque algunos resultados presentaban amplificación en el control negativo por lo que los mismos no son confiables y se descartaron quedando 1 039 resultados. La cantidad de estos representan alrededor del 1.43 % del total de las muestras positivas del periodo Mayo 2009 - Junio 2010 analizadas por el InDRE según una comparación aproximada con el número de muestras registradas por un informe de la SSA/CENAVECE cerca del mismo periodo.

De todos los resultados mencionadas anteriormente, pasaron por un segundo filtro, donde solamente 248 muestras fueron seleccionadas para el análisis molecular de acuerdo a su valor de $Ct \leq 33$, lo que representa una adecuada cantidad de ácidos nucleicos; dicho valor se tomo porque las muestras ya tenían un tiempo prolongado guardadas en los congeladores, además de los procesos de congelación y descongelación del que ya habían sido sometidas por análisis anteriores, características que afectan la estabilidad de los ácidos nucleicos (RNA), ya que estos son muy lábiles, y si se realizaba el análisis molecular sin tomar en cuenta esta variable probablemente se obtendrían muchos resultados negativos y otros más fuera de los criterios usados por el InDRE para el diagnóstico de Influenza pandémica ($Ct \geq 38$) por lo que se bajo 5 unidades de Ct para garantizar la integridad de los ácidos nucleicos en cada muestra.

Sin embargo, 71 muestras fueron las que se analizaron realmente porque eran las que se encontraban disponibles en ese momento, representando solamente 6.83 % del lote de resultados seleccionados inicialmente y 0.098 % de todas las muestras registradas por la SSA/CENAVECE.

En la subtipificación de la hemaglutinina se observa que además de existir HA de origen porcino, existen en las muestras los subtipos H1 y H3 estacional; a pesar de que se usó en el análisis el marcador para detectar el subtipo aviar éste no estuvo presente.

En la tabla 5 se muestran los valores de Ct de cada una de las muestras usadas durante el estudio; las primeras 4 columnas (verde) corresponden a los marcadores propuestos en el protocolo del CDC para diagnóstico de Influenza pandémica, las 3 columnas restantes (morado) son los marcadores usados para identificar Influenza A estacional (H1 y H3) e Influenza aviar (H5). Las filas que se encuentran de color blanco corresponden a muestras con respuesta de Influenza A estacional, ya sea del tipo H1 o del tipo H3, las filas de color amarillo corresponden a muestras con resultado de Influenza A H1 pandémico y las filas marcadas en color naranja son las que no fue posible determinar el tipo de HA en la muestra, en la cual presumiblemente presentan cambios en la secuencia nucleotídica del mismo gen que no permiten la determinación de su origen mediante RT-PCR en tiempo real. Se observan también dentro de la tabla asteriscos (*) que significa que esa muestra se sometió a los diferentes marcadores usados y no presentó amplificación, y la diagonal (/) que no se siguió usando otros marcadores porque en el inicio del análisis se obtuvo un valor adecuado por parte de la muestra.

De las 71 muestras usadas en el análisis, solamente se obtuvieron de 62 con algún valor de Ct, las 9 restantes se descartaron de la tabla 5 ya que no se observó ningún valor de Ct en todos los marcadores usados. En la tabla 6 se resume el número de las muestras con sus correspondientes resultados de la subtipificación de la HA incluidas las muestras descartadas.

En el gráfico 1 se aprecia de una manera notable la prominencia del nuevo subtipo viral de Influenza sobre los demás subtipos, seguido por el subtipo H3, las muestras no subtipificables, las muestras que presentaron degradación de los ácidos nucleicos y por último el subtipo H1.

Tabla 5. Valores de Ct de las muestras subtipificadas por RT-PCR en tiempo real obtenidas de las muestras de Influenza A (H1N1) pdm09 de México

MUESTRA	Marcador Usado/Valor de Ct							Resultado
	Inf A	Usw	H1 Sw	RP	H1 Est	H3 Est	H5	
01	33.9694	41.7946	*	29.1907	*	*	*	No Sub.
02	25.218	36.0665	*	27.2270	24.6003	*	*	H1 Est
03	31.9368	36.8526	*	32.4437	*	*	*	No Sub.
04	32.3071	42.0905	*	25.0870	*	*	*	No Sub.
05	28.0678	36.8422	*	25.3874	*	*	*	No Sub.
06	34.5325	31.9700	*	26.2263	*	*	*	No Sub.
07	29.4112	36.0920	*	36.0772	31.4733	*	*	H1 Est
08	32.6996	31.5896	*	26.1197	*	31.6874	*	H3 Est
09	33.2339	39.2083	*	42.6167	34.3682	*	*	H1 Est
10	27.2357	29.7030	37.1588	35.0280	/	/	/	H1 Sw
11	22.2589	33.1118	*	34.6995	*	23.0531	*	H3 Est
12	28.7775	41.0745	30.7811	28.1476	/	/	/	H1 Sw
13	30.3694	32.6131	32.3466	28.1815	*	*	*	H1 Sw
14	31.1974	32.6515	33.3033	29.5219	/	/	/	H1 Sw
15	22.7506	36.5223	*	28.9463	*	23.3772	*	H3 Est
16	33.7601	32.7846	35.6865	26.8052	*	*	*	H1 Sw
17	24.8492	36.6866	*	29.2764	*	23.6393	*	H3 Est
18	33.0724	32.2829	34.9005	26.4652	*	*	*	H1 Sw
19	24.5288	22.8582	26.9289	26.0815	/	/	/	H1 Sw
20	34.3849	33.4311	35.4257	29.1767	*	*	*	H1 Sw
21	28.1666	41.5215	31.2009	27.1324	/	/	/	H1 Sw
22	34.2439	33.1099	43.657	24.7893	*	*	*	H1 Sw
23	29.8298	31.2754	32.6133	28.6900	/	/	/	H1 Sw
24	30.8678	33.9315	32.0794	32.0863	*	*	*	H1 Sw
25	32.7181	31.0686	33.7053	29.4305	/	/	/	H1 Sw
26	38.2973	30.5466	*	28.8444	*	*	*	No Sub.
27	20.3908	40.9813	*	24.4496	*	20.1505	*	H3 Est
28	21.3654	34.7350	*	27.4223	*	20.7267	*	H3 Est
29	31.3000	32.2707	33.6834	30.1971	/	/	/	H1 Sw
30	30.2571	26.0298	32.3161	27.2568	/	/	/	H1 Sw

Tabla 5. (Continuación)

31	22.2797	44.7019	*	27.9384	*	22.0066	*	H3 Est
32	25.4757	44.4075	*	28.0086	*	24.6026	*	H3 Est
33	34.2709	41.0467	39.6208	30.7891	*	*	*	H1 Sw
34	24.6298	22.0580	26.4445	29.3128	/	/	/	H1 Sw
35	26.0098	26.2031	28.3569	27.0201	/	/	/	H1 Sw
36	34.2934	32.9852	*	24.9653	*	*	*	No Sub.
37	32.0307	34.6756	33.0891	36.9104	*	*	*	H1 Sw
38	17.7242	38.8108	*	22.0905	*	18.7827	*	H3 Est
39	27.5514	44.1994	*	28.0690	*	27.5074	*	H3 Est
40	30.0564	37.0956	32.2414	29.1960	*	*	*	H1 Sw
41	25.2171	43.7331	*	26.6448	*	25.6141	*	H3 Est
42	28.949	41.2384	*	30.5125	*	29.1592	*	H3 Est
43	32.5914	32.3395	34.8435	28.0969	*	*	*	H1 Sw
44	26.4997	44.2738	*	28.1889	*	26.1704	*	H3 Est
45	29.1537	29.4534	31.7744	28.3450	*	*	*	H1 Sw
46	34.3206	31.6436	*	24.0902	25.6083	*	*	H1 Est
47	28.9086	26.1911	30.9924	32.6874	/	/	/	H1 Sw
48	30.1216	37.1949	32.3945	29.0973	/	/	/	H1 Sw
49	28.1302	31.8280	30.3908	33.3540	/	/	/	H1 Sw
50	23.5567	28.3945	26.7532	27.2959	/	/	/	H1 Sw
51	33.3528	35.8979	*	27.0483	*	*	*	No Sub.
52	24.8477	25.4445	28.2146	30.2210	/	/	/	H1 Sw
53	28.2246	29.8760	30.8841	28.8208	*	*	*	H1 Sw
54	32.6947	31.6060	35.1912	28.5923	*	*	*	H1 Sw
55	25.7662	25.0780	31.7412	28.9532	/	/	/	H1 Sw
56	29.9463	30.4973	32.3546	28.2394	/	/	/	H1 Sw
57	31.8372	34.2724	*	29.4753	*	*	*	No Sub.
58	26.7166	44.5031	*	29.2445	*	28.0978	*	H3 Est
59	33.5198	34.2014	*	33.7548	*	*	*	No Sub.
60	29.037	31.9927	*	23.1588	*	*	*	No Sub.
61	31.324	30.9711	*	26.8294	*	*	*	No Sub.
62	32.0192	31.8213	34.6122	31.4194	*	*	*	H1 Sw

Tabla 6. Resultados de las muestras subtipificadas por RT-PCR en tiempo real, obtenidas de las muestras de Influenza A (H1N1) pdm09 de México

HA encontrada	Número de muestras
H1sw	32
H1 est	4
H3 est	14
H5	0
Inf A No Sub.	12
Material genético degradado	9
Total	71

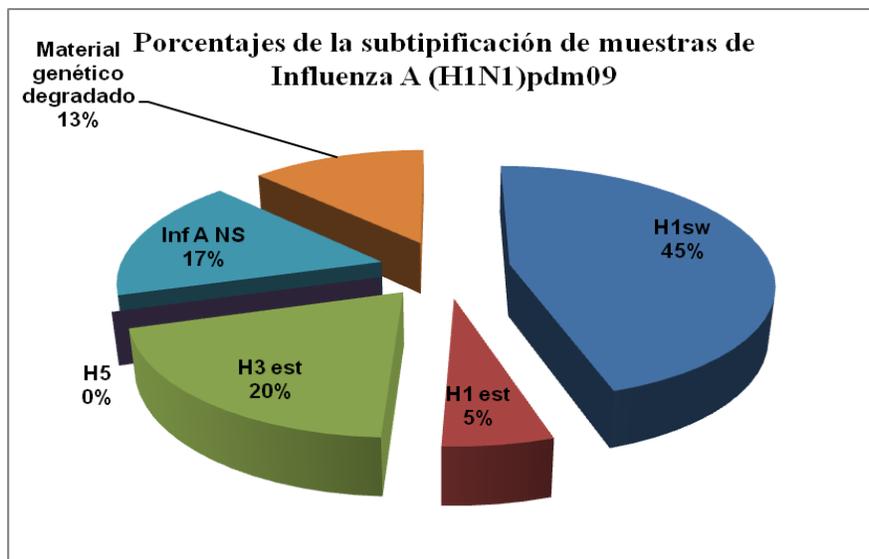


Gráfico 1. Porcentajes correspondientes a la subtipificación de la hemaglutinina en muestras de Influenza A (H1N1) pdm09 de México.

7. DISCUSIÓN

En el análisis molecular de la HA mediante RT-PCR en tiempo real, se confirmó que la mayoría de las muestras analizadas son de origen porcino, representando un 45 % del lote analizado; fue necesario realizarlo porque en el diagnóstico primario durante la pandemia de 2009 - 2010 mostraron un patrón negativo para el marcador de la HA, probablemente debido a dos factores: no se agregó reactivo (sonda, iniciadores ó enzima) o muestra en el pozo correspondiente al marcador HA. En el nuevo ensayo, varias muestras siguieron presentando el patrón antes mencionado por lo que el análisis comienza desde este punto, en búsqueda de una posible variante en el subtipo de HA de origen porcino (H1sw).

Los resultados arrojan 18 muestras que presentaron amplificación en el marcador del H1 estacional y H3 estacional, muestras que tienen un diagnóstico previo de Influenza pandémica, tal y como se indica en la segunda columna de color verde “Usw” de la tabla 5 de resultados, a pesar de que no exhibieron amplificación del H1sw, son consideradas como Influenza pandémica según el algoritmo para el diagnóstico de Influenza A pandémica. Esto indica que las muestras pertenecen a individuos que presentaron coinfección por dos subtipos virales (H1sw y H1 est ó H1sw y H3 est), coinfección que podría llevar a un reordenamiento genético y como consecuencia a un nuevo subtipo viral, sin embargo, el reordenamiento no se observó durante el trayecto de esta investigación.

Las coinfecciones halladas en este estudio actualmente no han tenido gran trascendencia, ya que se reportan rara vez en humanos y las publicaciones que han salido de ello son escasas. Según los reportes de Ducatez *et al* y Ghedin *et al* mencionan que el tiempo de detección y la frecuencia con que se presentan las coinfecciones pasan indetectables o de manera inadvertida. Ducatez *et al* por su parte menciona que los eventos de coinfecciones donde el virus de la Influenza A (H1N1) pdm09 esté involucrado no se han descrito debido a la carencia de otros virus de Influenza A en lugares donde éstos desaparecieron por la época en que surge la nueva pandemia y aunque en Nueva Zelanda en 2009 se encontraban en circulación virus de Influenza estacionales no se reportó ninguna coinfección, además de que se desconoce la capacidad de cepas de Influenza estacional y pandémica de generar una nueva progenie viral.

Este escenario es de particular preocupación debido al reordenamiento de un virus pandémico con su contemporáneo virus de la Influenza A estacional que podría compartir genes que generan resistencia a los inhibidores de la NA, además de los escasos estudios que se han venido realizando sobre coinfecciones humanas, porque no se dedica de lleno cuales podrían ser las condiciones para que en nuestra especie se produzca un reordenamiento genético que se mantenga y genere una nueva pandemia.

A más de 3 años iniciada la nueva pandemia el virus de la Influenza A (H1N1) pdm09 no se ha logrado adaptar con otros virus de Influenza estacionales a pesar de que ya se han encontrado coinfecciones. Sin embargo gran parte de las pandemias se debe a virus de Influenza porcinos, porque se ha observado que en éstos animales el virus es altamente adaptable y existe gran información de ello, que son considerados como “vasos mezcladores” por los 2 tipos de receptores celulares que posee en su aparato respiratorio (α -2,3 ácido siálico y α -2,6 ácido siálico).

En relación a lo anterior, Ramakrishnan *et al*, señalan en su reporte sobre la evolución de la Influenza A (H3N2) en América del Norte a finales de la década de los 90, donde el virus tuvo un reordenamiento genético con el virus de la Influenza porcina clásica, surgiendo un nuevo virus que se le denominó Influenza A TR-(H3N2) con genes de origen humano, porcino y aviar, que afectó a gran parte de la población porcina, así como aves silvestres, y aunque algunos seres humanos también fueron infectados no se logró la transmisión sostenida de humano a humano (personas que estuvieron en contacto directo con cerdos infectados). Sin embargo, en la publicación de Lindstrom *et al*, señalan en los años 2010 – 2011, este virus tuvo un segundo reordenamiento con el gen de la proteína M del nuevo virus de la Influenza A (H1N1) pdm09, al que denominaron Influenza A (H3N2)v, pero la transmisión sostenida de humano a humano es limitada por lo que no es de potencial pandémico.

Dentro de los 18 resultados positivos a algún subtipo de Influenza A estacional, el siguiente subtipo con mayor frecuencia de amplificación fue el H3 estacional con un 20 % y el subtipo H1 estacional con un 5 %. La frecuencia del H3 es mayor debido a que presenta una tasa de variación más elevada (6.7×10^{-3} mutaciones por sitio cada año específicamente en el dominio HA1), comparado con la variación del subtipo H1 (4×10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio cada año), ya que la información genética almacenada en el RNA viral es capaz de sufrir mutaciones importantes con relativa facilidad durante el proceso de replicación y como consecuencia de la presión selectiva por el sistema inmunitario del hospedero, confiriéndole gran variabilidad, una de las razones por la cual se producen epidemias y pandemias. De esta manera se explica que la evolución de los genes que codifican para las proteínas de superficie sea más rápida que los genes de las proteínas internas, fenómeno conocido como “derivado antigénico” (Mendoza G, y Vielma A., 2009; Xicohtécatl-Palacios *et al*, 2009).

Si se comparan éstos resultados con el resultado de la Influenza pandémica, se observa un desplazamiento de los 2 primeros subtipos virales por éste último, tal como lo reporta un informe de la CENA VECE/SSA en Marzo de 2012, donde se observa el mismo panorama de la prevalencia del virus de la Influenza pandémica sobre los de Influenza estacional.

Un 17 % de las muestras analizadas no fue posible determinar el subtipo de HA mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real propuesta en el protocolo del CDC. Esto se debe probablemente a la presencia de cambios en la secuencia de nucleótidos en la región utilizada para el diseño de los iniciadores y sonda, por lo que los mismos no reconocen la secuencia blanco y no generan señal de amplificación, o también se debe a la degradación del mismo gen que de existir todos los reactivos éste no se llevará a cabo porque no existe platilla alguna para ser amplificada por la técnica molecular a pesar de que los demás genes virales se encuentren en buenas condiciones (PB2, PB1, PA, NP, NA, M, NS), éstos resultados aparecen en la tabla 5 con la leyenda de “No Sub” (No Subtipificable). La presencia de posibles cambios en la región utilizada para el diagnóstico, puede dar lugar a la inferencia de cambios en otros sitios de la HA, siendo necesario realizar la secuencia nucleotídica de todo el gen para determinar la presencia de éstos cambios y verificar si se reflejan en la secuencia de la proteína codificada, por lo que la principal perspectiva de este trabajo es realizar la

secuenciación del fragmento de reconocimiento de los iniciadores y sondas de diagnóstico y, posteriormente del gen completo, así como la traducción de la secuencia de nucleótidos y su análisis filogenético, con el fin de determinar su origen mediante la comparación con secuencias de otros virus relacionados.

De las muestras analizadas, 13 % presentaron degradación total de los ácidos nucleicos porque en ningún marcador se observó respuesta a pesar de bajar el valor de Ct, por lo que aquí se observa la ventaja de bajar dicho valor, de lo contrario se hubieran observado más muestras negativas representando un gasto innecesario al hacer el análisis.

Finalmente no se observó ninguna muestra positiva a Influenza aviar de alta patogenicidad (H5) que es un buen indicio que en nuestro país este subtipo no se encuentra en circulación.

8. CONCLUSIONES

- Se encontraron 12 muestras de Influenza con posibles variantes genéticas en el gen de la HA, en las cuales esta proteína es no subtipificable mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizadas en este trabajo.
- Se llevo a cabo la búsqueda de muestras con diagnóstico y positivas a Influenza A H1N1 pandémico con una adecuada cantidad de ácidos nucleicos en las cuales se observó diferentes resultados en la subtipificación de la HA.
- Se logró determinar la HA presente en la mayoría de las muestras, encontrándose dos subtipos distintos al HA de origen porcino, H1 y H3 estacional, lo cual indica una coinfección intra-hospedero entre éstos y el de origen porcino que podría ocasionar un nuevo subtipo viral aunque éste no estuvo presente.
- No se identificaron 9 muestras ya que estas presentaron degradación de los ácidos nucleicos, ni tampoco se observo alguna muestra de Influenza aviar de alta patogenicidad.

9. REFERENCIAS CITADAS

- Baudin F, Bach C, Cusack S, and Ruigrok RW. 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J.* **13**: 3158-3165.
- Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper S A, Shaw M, Uyeki T M, Saki S R, Hayden F G, Hui D S, Kettner J D, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, and Nicholson K G. 2010. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N. Engl J. Med.* **362**:1708-1719.
- Betakova T. 2007. M2 Protein-A Proton Channel of Influenza A Virus. *Curr. Pharm. Des.* **13**: 3231-3235.
- Camargo C, Guatura SB, and Bellei N. 2012. Respiratory viral coinfection among hospitalized patients with H1N1 2009 during the first pandemic wave in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **16**: 180-183.
- Córdova-Villalobos JA, Sarti E, Arzoz-Padrés J, Manuell-Lee G, Méndez J R and Kuri-Morales P. 2009. The Influenza A (H1N1) Epidemic in Mexico. Lessons learned. *Health Res. Policy Syst.* **7**: 1-7.
- Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínicas.* **22**: 299-305.
- Ducatez MF, Sonnberg S, Hall RJ, Peacey M, Ralston J, Webby RJ and Huang QS. 2010. Genotyping assay for the identification of 2009–2010 pandemic and seasonal H1N1 influenza virus reassortants. *J Virol Methods.* **168**: 78-81.
- Fajardo-Dolci GE, Hernández-Torres F, Santacruz-Valera J, Rodríguez-Suárez J, Lamy P, Arboleya-Casanova H, Gutierrez-Vega R, Manuell-Lee G y Córdova Villalobos JA. 2009. Perfil Epidemiológico de la mortalidad por Influenza humana A (H1N1) en México. *Salud Pública Mex.* **51**. 361-371.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff J., Desselberger U. and Ball L.A. 2005. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. *ELSEVIER*. Chian. 681-693.
- García-García J y Ramos C. 2006. La Influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Pública Mex.* **48**: 244-267.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivaille P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier RA, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, López-Gatell H, Olivera H, López I, Myers CA, Faix D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD Jr, Boxrud D, Sambol AR, Abid SH, St George K, Bannerman T, Moore AL, Stringer DJ, Blevins P, Demmler-Harrison GJ, Ginsberg M, Kriner P, Waterman S, Smole S, Guevara HF, Belongia EA, Clark PA, Beatrice ST, Donis R, Katz J, Finelli L, Bridges CB, Shaw M, Jernigan DB, Uyeki TM, Smith DJ, Klimov AI and Cox NJ. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. **325**: 197-201.

Ghedini E, Fitch A, Boyne A, Griesemer S, DePasse J, Bera J, Zhang X, Halpin RA, Smit M, Jennings L, St George K, Holmes EC and Spiro DJ. 2009. Mixed Infection and the Genesis of Influenza Virus Diversity. *J Virol*. **83**: 8832-8841.

Greenbaum BD, Li OT, Poon LL, Levine AJ and Rabadan R. 2012. Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **109**. 3341-3346.

Harris, Eva. 1998. *A Low-Cost Approach to PCR, Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques*. Oxford University Press. USA. 9-29.

Hurt AC, Leang SK, Speers DJ, Barr IG and Maurer-Stroh S. 2012. Mutations I117V and I117M and Oseltamivir Sensitivity of Pandemic (H1N1) 2009 Viruses. *Emerg. Infect. Dis*. **18**: 109-112.

Intharathep P, Laohpongspaisan C, Rungrotmongkol T, Loisuangsinsin A, Malaisree M, Decha P, Aruksakunwong O, Chuenpenit K, Kaiyawet N, Sompornpisut P, Pianwanit S and Hannongbua S. 2008. How amantadine and rimantadine inhibit proton transport in the M2 protein channel. *J. Mol. Graph. Model*. **27**: 342-348.

Kang XP, Jiang T, Li YQ, Lin F, Liu H, Chang GH, Zhu QY, Qin ED, Qin CF and Yang YH. 2010. A duplex real-time RT-PCR assay for detecting H5N1 avian influenza virus and pandemic H1N1 influenza virus. *Virol. J*. **7**: 113.

Knipe, David M., Howley, Peter M., Griffin, Diane E., Martin, Malcolm A., Lamb, Robert A., Roizman, Bernard and Straus, Stephen E. 2001. *Fields: Virology*. Fourth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA. 1487-1569.

Lindstrom S, Garten R, Balish A, Shu B, Emery S, Berman L, Barnes N, Sleeman K, Gubareva L, Villanueva J and Klimov A. 2012. Human Infections with Novel Reassortant Influenza A (H3N2)v Viruses, United States, 2011. *Emerg. Infect. Dis*. **18**. 834-837.

Luchsinger Vivian. 2009. Características del virus Influenza y diagnóstico de laboratorio. *Neumología Pediátrica*. **4**: 3-5.

Ma W, Lager KM, Lekcharoensuk P, Ulery ES, Janke BH, Solórzano A, Webby RJ, García-Sastre A and Rich JA. 2010. Viral reassortment and transmission after co-infection of pigs with classical H1N1 and triple-reassortant H3N2 swine influenza viruses. *J. Gen. Virol.* **91**: 2314-2321.

Martín-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta JM, Carrascosa JL y Ortín J. 2001. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep.* **2**: 313-317.

McCaughey C. 2010. Influenza: a virus of our times. *Ulster Med. J.* **79**: 46-51.

Memoli MJ, Jagger BW, Dugan VG, Qi L, Jackson JP and Taubenberger JK. 2009. Recent Human Influenza A/H3N2 Virus Evolution Driven by Nobel Selection Factors in Addition to Antigenic Drift. *J. Infec. Dis.* **200**: 1232-1241.

Mendoza G, y Vielma A. 2009. Influenza: datos biológicos y epidemiológicos claves para una mejor comprensión de la actual pandemia. *Rev. Fac. Farm.* **51**: 46-53.

Orraca-Castillo O, González-Valdés L M, Casanova-Moreno M C, Guerra-del Valle D y Sanabria-Negrín J G. 2010. Inmunopatología de la Influenza A H1N1. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río.* **14**: 280-294.

Osores-Plengue F, Gómez-Benavides J, Suárez-Ognio L, Cabezas-Sánchez C, Alave-Rosas J y Maguiña-Vargas C. 2009. Un nuevo virus A/H1N1, una nueva pandemia: Influenza un riesgo permanente para la humanidad globalizada. *Acta médica Peruana.* **26**: 97-130.

Payungporn S, Panjaworayan N, Makkoch J, and Poovorawan Y. 2010. Molecular characteristics of the human pandemic influenza A virus (H1N1). *Acta Virol.* **54**: 155-163.

Polo-Gamboa JA. 2009. Aspectos Moleculares del Virus de la Influenza A Subtipo H1N1. *Revista Médica Vallejana.* **6**: 47-54.

Ramakrishnan MA, Wang P, Abin M, Yang M, Goyal SM, Gramer MR, Redig P, Fuhrman MW and Sreevatsan S. 2010. Triple reassortant swine Influenza A (H3N2) virus in waterfowl. *Emerg. Infect. Dis.* **16**: 728-730.

Ramírez-González JE, González-Duran E, Alcántara-Pérez P, Wong-Arámbula C, Olivera-Díaz H, Cortéz-Ortiz I, Barrera-Badillo G, Nguyen H, Gubareva L, López-Martínez I, Díaz-Quiñonez JA, Lezana-Fernández MA, Gatell-Ramírez HL, Córdova-Villalobos JA, Hernández-Ávila M and Alpuche-Aranda C. 2011. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Mexico. *Emerg. Infec. Dis.* **17**: 283-285.

Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R and Ortín J. 2011. The Influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol.* **8**: 1-9.

Salazar MI, López-Ortega O, León-Ávila G, Ramírez-González JE y Castro-Mussot ME. 2010. El Origen de la variabilidad genética de los virus de Influenza. *Gac. Med. Mex.* **146**: 199-206.

Schnell JR and Chou JJ. 2008. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature.* **451**: 591-596.

Talledo M y Zumaeta K. 2009. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Rev. Peru. Biol.* **16**: 227-238.

Weinstock DM and Zuccotti G. 2009. The evolution of influenza resistance and treatment. *JAMA.* **301**: 1066-1069.

Xicohténcatl-Palacios, Rosa del Carmen, Fernández Jaramillo, Nora y Montaña Hirose, Juan. 2009. Un mundo, una salud. El caso de la Influenza. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Zárate-Segura PB. 2010. Diseño de una Prueba Específica y Diferencial para el Diagnóstico Molecular de Influenza A H1N1. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México. 1-21.

Zepeda-Lopez HM, Perea-Araujo L, Miliar-García A, Domínguez-López A, Xoconostle-Cázarez B, Lara-Padilla E, Ramírez-Hernández JA, Sevilla-Reyes E, Orozco ME, Ahued-Ortega A, Villaseñor-Ruiz I, García-Cavazos RJ y Teran LM. 2010. Inside the outbreak of the 2009 influenza A (H1N1)v virus in Mexico. *PLoS One.* **5**: 1-6.

10. PÁGINAS WEB CITADAS

- 1) Lamarino, Atila. 2009. Molécula del mes presenta: Hemaglutinina y Neuraminidasa. Biblioteca virtual en salud. Gripe por A (H1N1) blog. (Consultado en Diciembre de 2011)
URL: <http://blog.h1n1.influenza.bvsalud.org/es/2009/09/12/molecula-del-mes-presenta-hemaglutinina-y-neuraminidasa/>
- 2) Nueva gripe A (H1N1) causada por el virus pandémico Influenza A (H1N1) 2009. Comité de emergencias biológicas de la red de Hospitales e Institutos de la Universidad de Buenos Aires-Argentina. 2010. Nueva gripe A (H1N1) causada por el virus pandémico Influenza A (H1N1) 2009. (Consultado en Diciembre de 2011)
URL: <http://www.uba.ar/download/noticias/gripea.pdf>
- 3) BioCryst Pharmaceuticals Inc. 2011. Peramivir (Neuraminidase Inhibitor). (Consultado en Noviembre de 2011)
URL: <http://www.biocryst.com/peramivir>
- 4) Racaniello, Vincent. 2009. Virology blog: About viruses and viral disease. (Consultado en Octubre de 2011).
URL: <http://www.virology.ws/2009/05/01/influenza-virus-rna-genome>
- 5) Organización Mundial de la Salud. 2009. Protocolo del CDC para el RT-PCR en tiempo real para el nuevo subtipo del virus de influenza A (H1N1). (Consultado en Noviembre de 2011).
URL: http://cidbimena.desastres.hn/docum/AH1N1/CDCrealtimetrpcrprotoc_SPA20090430.pdf
- 6) Life Technologies. 2012. qPCR vs Digital PCR vs Tradicional PCR. (Consultado en Marzo de 2012).
URL: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-vs-traditional-pcr.html?ICID=EDI-Lrn2>
- 7) Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Influenza: Swine origin (triple reassortant) H3N2 viruses. Biomedical Technology, Epidemiology and Food Safety. (Consultado en Enero de 2012).
URL: <http://www.cdc.gov/media/subtopic/heard.htm#h3n2>
- 8) Jhung, Michael. 2012. Variant H3N2 Influenza Virus: What you should know. Green Pasture. (Consultado en Enero de 2012).
URL: <http://www.greenpasture.org/fermented-cod-liver-oil-butter-oil-vitamin-d-vitamin-a/variant-h3n2-influenza-virus-what-you-should-know/>

- 9) Universitat de Girona. PCR cuantitativa. (Consultado en Diciembre de 2011).
URL: <http://www.udg.edu/serveis/STRUBM/T%C3%A8cniques/PCRquantitativa/tabid/13251/language/es-ES/Default.aspx>
- 10) Secretaría de Salud. 2012. Estadísticas de Influenza 2012. (Consultado en Mayo de 2012)
URL: <http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza/estadisticas.html>
- 11) Ramos Jiménez, Javier. 2009. La pandemia del virus de la Influenza A H1N1 en el 2009. Revista Salud Pública y Nutrición. **10**. (Consultado en Mayo de 2012).
URL: <http://www.respyn.uanl.mx/x/2/editorial/editorial.htm>
- 12) CDC/MMWR. 2009. Novel Influenza A (H1N1) Virus Infection Mexico, March-May, 2009. (Consultado en Mayo de 2012).
URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5821a2.htm>
- 13) Secretaría de Salud. 2011. Perfil Epidemiológico de la Pandemia de Influenza A (H1N1) 2009 en México. (Consultado en Mayo de 2012).
URL: http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/MONOGRAFIAS/PEPID_PANDEMIA_INFLUENZA_AH1N12009.pdf