



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**VARIACIÓN GENÉTICA DE LA NEURAMINIDASA DEL VIRUS DE
INFLUENZA A H1N1 PANDEMICO DURANTE EL PERIODO 2009-
2012 POR SECUENCIACIÓN CAPILAR.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE MÉNDEZ GALINDO

ASESOR: M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

COASESORES: M. EN C. PATRICIA AMALIA ALCÁNTARA PÉREZ

DR. JOSÉ ERNESTO RAMÍREZ GONZÁLEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

U.N.A.M.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
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.
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Variación genética de la Neuraminidasa del virus de influenza A H1N1 pandémico durante el período 2009-2012 por secuenciación capilar

Que presenta la pasante: María Guadalupe Méndez Galindo
Con número de cuenta: 305057345 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Biológica

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 24 de abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
VOCAL	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	QFB. Sara Hernández Matilde	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

Dedico este logro a mi familia: mis hermanos, mi novio y mis padres, expresando el más profundo agradecimiento a la mujer a la que debo todo lo que soy en la vida... mi muy amada madre.

A mi querida amiga Claudia, mi gran apoyo en la facultad y en la vida.

Agradezco a mis asesores: Ana, Paty y Ernesto, el tiempo que dedicaron a la planeación, desarrollo y revisión este proyecto.

Gracias a los compañeros del InDRE: Susy, Claudia W., Juan, Víctor, Lidia, Brisia, Abril, Aida, Sandra, Joanna, Eli, Noé, Mari y Claudia G. por su apoyo, comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico.....	5
3.1 Historia de la influenza.....	5
3.2 Clasificación y nomenclatura.....	9
3.3 Propagación.....	10
3.4 Morfología.....	11
3.5 Propiedades.....	12
3.6 Organización del genoma.....	12
3.7 Proteínas virales.....	14
3.7.1 Subunidades polimerasa (PB1, PB2 y PA).....	15
3.7.2 Hemaglutinina (HA).....	15
3.7.3 Nucleoproteína (NP).....	17
3.7.4 Neuraminidasa (NA).....	17
3.7.5 Proteínas de matriz y canal iónico (M1 y M2).....	19
3.7.6 Proteínas no estructurales (NS1 y NS2).....	19
3.8 Variabilidad.....	20
3.9 Tropismo viral.....	24
3.10 Replicación.....	25
3.11 Reservorio.....	29
3.12 Epidemiología.....	30
3.13 Patogenia.....	31
3.14 Manifestaciones clínicas.....	32
3.15 Respuesta inmune.....	33
3.16 Diagnóstico.....	34
3.17 Profilaxis.....	34
3.18 Tratamiento con fármacos antivirales.....	35
3.19 Secuenciación del DNA.....	38

3.20 Vigilancia epidemiológica.....	42
4. Justificación	44
5. Hipótesis	44
6.0 Objetivos	45
7.0 Metodología	46
7.1 Diagrama de Flujo.....	46
7.2 Selección de muestras.....	47
7.3 Extracción del RNA	47
7.4 Diseño de iniciadores	47
7.5 Amplificación	49
7.6 Electroforesis.....	49
7.7 Cuantificación.....	50
7.8 Secuenciación automática en el secuenciador 3130xl	50
7.9 Análisis de secuencias.....	52
8 Resultados y discusión	53
9 Conclusiones	63
10 Referencias	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pandemias de la influenza A	7
Tabla 2. Fases de la pandemia de la influenza según la OMS	9
Tabla 3. Características generales del virus de la influenza	12
Tabla 4. Mutaciones encontradas en 16 secuencias completas del gen de la NA durante el 2012	43
Tabla 5. Mezcla de reacción para la RT-PCR.....	49
Tabla 6. Mezcla de reacción para la secuenciación	51
Tabla 7. Secuencias incluidas en el análisis bioinformático y su procedencia	55
Tabla 8. Análisis gradual de 31 secuencias obtenidas durante 2009-2011, para el rastreo de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K	57
Tabla 9. Ocurrencia de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K en México...	58
Tabla 10. Ocurrencia mundial de la mutación G41R	59
Tabla 11. Ocurrencia mundial de las mutaciones N44S, V241I y N369K	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema de un embrión de pollo.....	10
Fig. 2 Estructura del virus de la influenza y sus proteínas	11
Fig. 3 Esquema de la composición del virus de la influenza, vista frontal	11
Fig. 4 Genoma del virus de la influenza A	13
Fig. 5 Proteínas del virus de la influenza	14
Fig. 6 Hemaglutinina	16
Fig. 7 Estructura primaria la HA	17
Fig. 8 Distribución de la HA y la NA en la superficie del virus de la influenza	17
Fig. 9 Estructura tridimensional de la NA	18
Fig. 10 Sitio del corte del ácido siálico por la NA	18
Fig. 11 Esquema que representa una variación menor, suficiente para esquivar la respuesta inmune del hospedero	21
Fig. 12 Esquema que representa una variación mayor, suficiente para dar origen a un virus antigénicamente nuevo	21
Fig. 13 Variación genética en el virus de la influenza	23
Fig. 14 Origen del virus pandémico	24
Fig. 15 Replicación del virus de la influenza	28
Fig. 16 Animales que infecta el virus de la influenza	29
Fig. 17 Tiempo necesario para el proceso de la producción de la vacuna estacional	35
Fig. 18 Mecanismo de acción de los inhibidores de la proteína M2	36
Fig. 19 Mecanismo de acción de los Inhibidores de la NA	37
Fig. 20 Método de Maxam y Gilbert	39
Fig. 21 Método de Sanger	40
Fig. 22 Secuenciación automatizada	41
Fig. 23 Extracción de RNA.....	47
Fig. 24 Mapa de amplificación de la NA	48
Fig. 25 Programa utilizado para la RT-PCR.....	49

Fig. 26 Programa para la reacción de secuenciación	51
Fig. 27 Purificación de los productos de extensión	51
Fig. 28 Gel de agarosa 2%	53
Fig. 29 Electroforesis de los fragmentos X de diferentes muestras en el Bioanalizador Agilent 2100	54
Fig. 30. Mapa de la distribución de las muestras 2009 – 2012.....	55
Fig. 31 Electroferogramas obtenidos, vistos en Chromas.....	56
Fig. 32 Distribución geográfica de la mutación G41R.	59
Fig. 33 Árbol filogenético de cepas del virus de la influenza A (H1N1) pdm circulantes durante 2011-2012.....	61

ABREVIATURAS

CAP	Casquete de 5-metilguanosa
CDC	Center for Diseases Control
cRNA	RNA complementario
dATP	Deoxi adenosín trifosfato
dCTP	Deoxi citidina trifosfato
ddATP	Dideoxi adenosín trifosfato
ddCTP	Dideoxi citidina trifosfato
ddGTP	Dideoxi guanosín trifosfato
ddNTP	Dideoxinucleótidos
ddTTP	Dideoxi timidina trifosfato
dGTP	Deoxi guanosín trifosfato
dNTP	Deoxinucleótidos
dTTP	Deoxi timidina trifosfato
FDA	Food and Drug Administration
Gal	Galactosa
GNMP	Genoma de patógenos
HA	Hemaglutinina
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
INA's	Inhibidores de la neuraminidasa
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney
mRNA	RNA mensajero
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína de exportación nuclear

NES	Señal de exportación nuclear
NP	Nucleoproteína
nRNA	RNA nuclear
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORFs	Marco de lectura abierto
PA	Polimerasa A
PB1	Polimerasa B 1
PB2	Polimerasa B 2
pdm	Pandémico
RNPs	Ribonucleoproteínas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una transcriptasa reversa.
SA	Ácido siálico
vRNA	RNA viral

1. RESUMEN

La epidemia de influenza A (H1N1) en 2009 ha puesto al mundo en alerta constante ante nuevos brotes, principalmente porque es una enfermedad conocida desde la antigüedad que no se ha podido erradicar y que causa desde un malestar general hasta la muerte por la presencia de nuevos tipos. En este trabajo se presenta un análisis retrospectivo en busca de la aparición de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K en la secuencia del gen que codifica para la proteína neuraminidasa (NA) del virus de la influenza A (H1N1) pandémico (pdm) que ha circulado en México hasta el 2012, mediante la comparación de 47 secuencias, obtenidas por secuenciación capilar, con la cepa de referencia NA/H1N1/Human/2009/California07 [GenBank: FJ984386.1].

Una vez que se analizaron estas secuencias y se determinó si presentaban o no las mutaciones buscadas, se encontró que: A) las mutaciones G41R, N44S y N369K pudieron surgir por deriva antigénica durante el 2010, para quedar asentados en la temporada 2011 - 2012. B) La mutación V241I podría ser una característica común del virus pandémico desde su aparición en 2009. C) Las mutaciones V241I y N369K pueden contrarrestar los efectos desestabilizadores en la estructura del la NA provocados por la mutación H275Y. D) Los efectos la mutación N44S aun son desconocidos aunque inicialmente se pensaba que podía tener efectos en la antigenicidad de estas cepas. E) Las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K tienen importancia filogenética.

2. INTRODUCCIÓN

Durante la replicación del virus de la influenza pueden ocurrir errores debido a que utiliza un complejo de polimerasas virales que no tienen capacidad de lectura de prueba o de corrección de errores. La ocurrencia de algunas mutaciones específicas puede afectar el tropismo del virus por un determinado hospedador, la virulencia de las cepas y su transmisibilidad.

En abril del 2009 en México comenzó a circular un nuevo virus de la influenza identificado como influenza A (H1N1). La propagación de este virus fue inminente y el primer brote se identificó en la región sureste para luego continuar por el centro y norte del país ⁽¹⁾.

Las pruebas iniciales de resistencia a antivirales durante la pandemia de gripe en 2009 por el virus de la influenza A (H1N1) mostraron que era susceptible a los inhibidores de la NA (INA's) y resistente a los adamantanos. Sin embargo, el 29 de junio del mismo año, se detectó en Dinamarca el primer caso de resistencia a oseltamivir de este nuevo virus debido a la mutación H275Y, una sustitución de la histidina por tirosina en la posición 275 en la NA y entre el 2 y 3 de julio del 2009, se reportaron otros dos casos de resistencia a dicho antiviral en Japón y Hong Kong respectivamente ⁽²⁾.

El 8 de julio la OMS (*Organización Mundial de la Salud*) declaró que no existían evidencias de que se hubiera producido una amplia diseminación de resistencia al oseltamivir, luego de que la Red de Vigilancia Global de la Influenza para la Resistencia Antiviral analizara alrededor de 1000 cepas del virus pdm sin detectar dichas mutantes ⁽²⁾.

Para el 6 de agosto el CDC (*Center for Diseases Control*) encontró evidencia de resistencia a oseltamivir en la ciudad de Seattle, Washington en dos pacientes con inmunodepresión grave que presentaban infección por el virus pdm. Los pacientes inmunodeprimidos que contraen la influenza pueden propagar el virus por periodos prolongados, aumentando la probabilidad de que se desarrolle resistencia farmacológica ⁽³⁾.

En México, durante mayo del 2009 - abril del 2010, se analizaron en el InDRE (*Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*) 692 muestras, encontrando en una de ellas la presencia de la mutación H275Y. Se trataba de una niña de ocho meses de edad, la cual había recibido tratamiento antiviral con oseltamivir, requiriendo además de otros fármacos antimicrobianos (ceftriaxon y vancomicina) para su tratamiento. Durante el análisis de dicha secuencia se descartó la presencia de otras mutaciones relacionadas con resistencia a INA's. Esta muestra fue probada en el CDC con un ensayo de inhibición de la NA, mostrando un incremento del 50% en la concentración inhibitoria de oseltamivir con respecto al control, además de que la susceptibilidad ante zanamivir no había sido modificada ⁽⁴⁾.

En un estudio de secuenciación ultra profunda para la caracterización del virus pdm circulante durante 2011-2012, en el que se utilizó una muestra de hisopado nasofaríngeo para propagar el virus en células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), se detectaron 7 mutaciones en la NA: G41R, N44S, V83M, V106I, V241I, N248D y N369K, en relación con la cepa de referencia NA/H1N1/Human/2009/California07. El estudio reporta que las sustituciones V106I y N248D son marcadores de variante comunes en el virus pdm del 2009 y que la mutación G41R tiene particular relevancia ya que es una mutación en una posición equivalente a la del subtipo N2 que está relacionada a una fuerte resistencia a oseltamivir ⁽⁵⁾.

Desde su aparición en 2009, el virus de la influenza A (H1N1) pdm ha presentado diversas mutaciones, especialmente en los genes de la hemaglutinina (HA) y de la NA, sin embargo algunas de estas mutaciones podrían no fijarse en la población circulante mientras que otras conseguirían persistir hacia otras temporadas, lo que podría ser determinante para su patogenicidad.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Historia de la influenza

La influenza es una enfermedad altamente infectocontagiosa de la cual se tienen registros históricos descriptivos desde la época griega y de certeza etiológica tan solo hace casi nueve décadas atrás ⁽⁶⁾.

Numerosos autores que han estudiado los primeros datos en relación con la influenza tienen el convencimiento de que la enfermedad se conocía desde el año 400 a. C. En los escritos médicos griegos “El Libro IV de las Epidemias”, ya es posible encontrar referencias hechas por Hipócrates de lo que podría ser una enfermedad similar a la influenza, desafortunadamente no existen registros históricos certeros debido al comportamiento variable que la caracteriza, y a su desaparición por largos períodos ⁽²⁾.

La denominación de influenza, para las infecciones provocadas por los virus de la familia *Orthomyxovirus*, fue introducida por el Papa Benedicto XIV en el siglo XV durante la edad media cuando existía la creencia generalizada de que las epidemias eran debidas a la influencia de los astros, en ese entonces el término *influenza* se utilizaba para describir indistintamente varias enfermedades diferentes ⁽²⁾.

La evolución del pensamiento médico, alrededor del siglo XVIII, empezó a cuestionar la afirmación de que los astros influían en las enfermedades, por lo que se comenzó a utilizar el término como una contracción de «*influenza di freddo*», es decir «influencia del frío», pues se había observado que era una enfermedad que se daba predominantemente en los meses fríos ⁽²⁾.

El término gripe es de origen francés y suele usarse como sinonimia. La primera descripción de esta enfermedad ocurre después de la batalla de Bosworth Field (22 de agosto de 1485), cuando Enrique Tudor derrota a Ricardo III, pues al regresar a Londres el ejército vencedor había sido atacado por una gripe que causó la muerte de cientos de soldados. La enfermedad era de corta duración, con muerte o recuperación total en pocos días, manifestada por fiebre alta, cefalea, dolor articular y sudor mal oliente, probablemente relacionado con la escasa higiene de la época, al que se le conoció como *sudor anglicus* o *transpiración inglesa*. Durante este período hubo brotes sucesivos uno de los cuales llegó a Alemania en donde se le conoció como *peste inglesa* ⁽²⁾.

En 1892, cuando Richard Pfeiffer identifica al bacilo *Haemophilus influenzae*, llega erróneamente a la conclusión de que esta bacteria Gram negativa de forma variable era la causa de la gripe. Así, la etiología de la influenza permanecería desconocida hasta 1930-1933, cuando se logró aislar por primera vez a nivel de laboratorio el agente etiológico de esta enfermedad, primero en cerdos por Richard Schope y luego en humanos, a partir de secreciones respiratorias, por un grupo de investigación dirigido por Patrick Laidlaw y el Medical Research Council del Reino Unido y fue denominado virus de la influenza tipo A ⁽⁶⁾.

Desde entonces es quizás el virus humano mejor estudiado, su estructura bien caracterizada y su genoma secuenciado; sin embargo el desarrollo de vacunas y antivirales no han podido resolver el problema sanitario de la gripe ⁽⁷⁾.

Durante el siglo XX la primera gran pandemia de influenza ocurrió entre 1918 y 1920 durante la Primera Guerra Mundial y fue denominada “gripe o

influenza española”. Aunque el virus no se originó en España, éste fue el primer país afectado del continente europeo, donde se le dio una gran cobertura de prensa a los primeros surgimientos de la enfermedad, motivo por el cual se le otorgó esta denominación ⁽⁶⁾ y fue en el año 2005 cuando Taunbenberger y sus colaboradores anunciaron que finalmente tenían la secuencia completa del virus causante de ésta gripe y que se trataba del virus de la influenza A (H1N1) ⁽⁸⁾. La segunda y tercera pandemias producidas por dos subtipos virales emergentes denominados H2N2 y H3N2, ocurrieron en 1957 y 1968 y le denominaron “influenza asiática” e “influenza de Hong Kong” ⁽⁶⁾ (Tabla 1).

Tabla 1. Pandemias de la influenza A ^(6,9).

Nombre de la pandemia	Fecha	Muertes	Subtipo de virus
Gripe española	1918-1920	40-50 millones	H1N1
Gripe asiática	1957-1958	1-1.5 millones	H2N2
Gripe de Hong Kong	1968-1969	0.75-1 millones	H3N2
Gripe porcina	2009	< 0.1 millones	H1N1

El subtipo predominante del linaje humano que ha circulado en los últimos 20 años ha sido el H3N2, salvo en el período 1998-2001 en el que circuló preferentemente el H1N1.

En el 2001 apareció un nuevo subtipo de influenza A denominado H1N2 que se generó posiblemente por el reordenamiento entre los subtipos H3N2 y H1N1 cocirculantes. Luego en el 2002, otro subtipo nuevo parecido al A/Fujian/411/02(H3N2) surgió por deriva antigénica en Asia y causó brotes en todos los continentes, provocando una severa ola epidémica de gripe estacional en el hemisferio norte durante el invierno del 2003-2004.

Del 2004 al 2009 los virus de la influenza de los subtipos H1N1, H3N2 e Influenza B han cocirculado, predominando el H3N2. Simultáneamente a estos eventos han circulado también las cepas aviares H5N1, H7N7, H9N2 y las cepas porcinas capaces de enfermar al hombre directamente. Actualmente se ha observado un incremento en la virulencia de los subtipos H5N1 aislados en casos humanos así como su transmisión a gatos y la transmisión a perros del virus aviar H3N2 ⁽⁶⁾.

En abril del 2009 se detectó el nuevo virus de la influenza A (H1N1) capaz de infectar a humanos, éste es un subtipo reordenado en el que también participaron virus de la influenza aviar y humana, por lo que su denominación de virus de la influenza porcina ha sido incorrecta ⁽⁶⁾.

Para el 25 de abril del mismo año la OMS informa al mundo sobre la epidemia causada por este virus, notificado primero por Estados Unidos en dos niños al sur de California y casi paralelamente por México, calificándolo como Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII) bajo el reglamento sanitario internacional ⁽⁶⁾.

El 27 de abril, el nivel de alerta pandémica se eleva a fase 4 y el 29 de abril a fase 5 ⁽⁶⁾.

Finalmente, la OMS decreta la fase 6 el 11 de junio del 2009 con 46, 737 infectados por el virus en todo el mundo y 74 países afectados con 141 fallecidos (Tabla 2) ⁽⁶⁾.

Esta última fase se caracteriza por los criterios que definen la fase 5, acompañados de la aparición de brotes comunitarios en al menos un tercer país de una región distinta ⁽⁶⁾.

Tabla 2. Fases de la pandemia de la influenza según la OMS ⁽¹⁰⁾.

Fase	Riesgo	Nivel
Fase interpandémica Nuevo virus en animales, sin casos humanos	Bajo riesgo de casos humanos	1
	Alto riesgo de casos humanos	2
Alerta pandémica Nuevo virus causa casos humanos Pandemia	No hay transmisión interhumana, o es muy limitada	3
	Evidencia de transmisión interhumana aumentada	4
	Evidencia de transmisión interhumana significativa	5
Pandemia	Transmisión interhumana eficiente y sostenida	6

3.2 Clasificación y nomenclatura

El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomixoviridae*, cuyo nombre deriva del griego *orthos*: derecho, y *myxo*: mucus. Existen tres géneros del virus de la influenza A, B y C. El ordenamiento alfabético de los tres tipos corresponde a su importancia epidemiológica y clínica. Los virus de la influenza A producen infección en humanos y animales (aves, porcinos, equinos, focas) mientras que los virus de la influenza B y C están asociadas sólo a enfermedades humanas ⁽⁷⁾.

Cada cepa del virus de la influenza se denomina internacionalmente indicando el género o tipo de virus (A, B, C), el nombre en inglés de la especie animal de la que se aisló (excepto si es de humano), el lugar del aislamiento, el número de caso del laboratorio, el año de su aislamiento y entre paréntesis, se escribe el subtipo de HA y NA. Por ejemplo: A/goosер/Guandong/1/96 (H5N1) ⁽¹¹⁾.

3.3 Propagación

Los virus de la influenza pueden ser propagados en huevos embrionados de gallina o en un gran número de sistemas de cultivos primarios. Una de las líneas celulares para la propagación de éste virus es la MDCK, el efecto citopático (vacuolización y muerte celular) indica replicación viral, sin embargo el cultivo en huevos embrionados es aún el sistema de elección para la producción de vacunas y para la generación de grandes cantidades de virus ⁽¹³⁾.

Muchas de las cepas del virus de la influenza A y cepas de virus aviaries pueden ser aisladas directamente de la cavidad alantoidea pero algunos virus A y B necesitan ser aislados primeramente de la cavidad amniótica y después adaptados a crecer en la cavidad alantoidea (Fig. 1). La replicación en estos sistemas se detecta por hemaglutinación, lo que sugiere la presencia de la progenie viral ⁽¹³⁾.

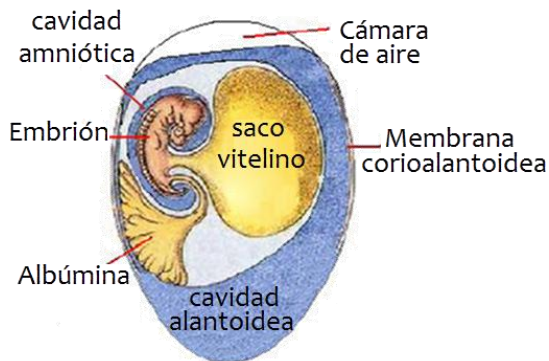


Fig. 1. Esquema de un embrión de pollo ⁽¹²⁾.

3.4 Morfología

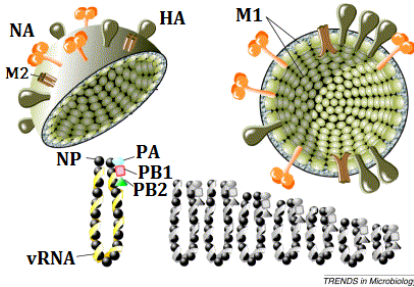


Fig. 2. Estructura del virus de la influenza y sus proteínas ⁽¹⁴⁾.

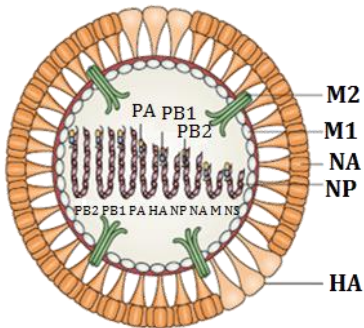


Fig. 3. Esquema de la composición del virus de la influenza, vista frontal ⁽¹⁵⁾.

Todos los virus de la influenza comparten características como el diámetro, la forma, la presencia de una envoltura y el tipo de genoma (Tabla 3) ⁽¹¹⁾.

Al microscopio electrónico estos virus tienen una apariencia pleomórfica y la envoltura corresponde a una bicapa de lípidos derivados de la membrana celular, de la cual sobresalen alrededor de 500 espículas conformadas por las glicoproteínas HA y NA ⁽¹¹⁾.

Hacia el interior de la partícula viral, existe una capa formada por la proteína matriz (M1) y más al interior, está la nucleocápside de simetría helicoidal, constituida por los complejos polimerasa y nucleoprotéico (NP) que incluye el genoma viral (Fig. 2 y 3) ⁽¹¹⁾.

Tabla 3. Características generales del virus de la influenza ⁽¹¹⁾.

Característica	Especificaciones
Clasificación de Baltimore	V
Genoma viral	RNA de polaridad (-), formado por 12, 000 a 15, 000 nucleótidos
Cadena	Sencilla
Segmentos	7 (influenza C, no posee HA) u 8 fragmentos (influenza A y B)
Simetría	Helicoidal
Forma	Esferoidal
Tamaño	50-120 nM
Presencia de envoltura	Sí

3.5 Propiedades

En términos generales en el ambiente, los virus de la influenza pueden sobrevivir en un rango de 4 a 6 hasta más de 30 días en temperaturas que oscilan entre 37° C y 0° C, pero por unos cuantos segundos a 70° C son inactivados y su persistencia es inversamente proporcional al pH, temperatura y salinidad del medio. Además, estos virus son relativamente más resistentes o estables que otros, pueden almacenarse entre 0 y 4° C durante semanas sin pérdida de su viabilidad. Los viriones son muy sensibles al calor, radiaciones UV y a la acción de solventes orgánicos, desinfectantes a base de alcohol y compuestos químicos como el éter, formaldehído, cloro, detergentes y agentes oxidantes que destruyen su infectividad ^(6, 8, 16).

3.6 Organización del genoma

El genoma del virus de la influenza está formado por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (contraria a la del mRNA) (Fig. 4). El tamaño de los segmentos de RNA varía de 890 a 2341 nucleótidos.

Todos los segmentos tienen secuencias terminales conservadas en los extremos 5' y 3' que además son parcialmente complementarias y se encuentran asociadas entre sí con el complejo de la polimerasa (13,17).

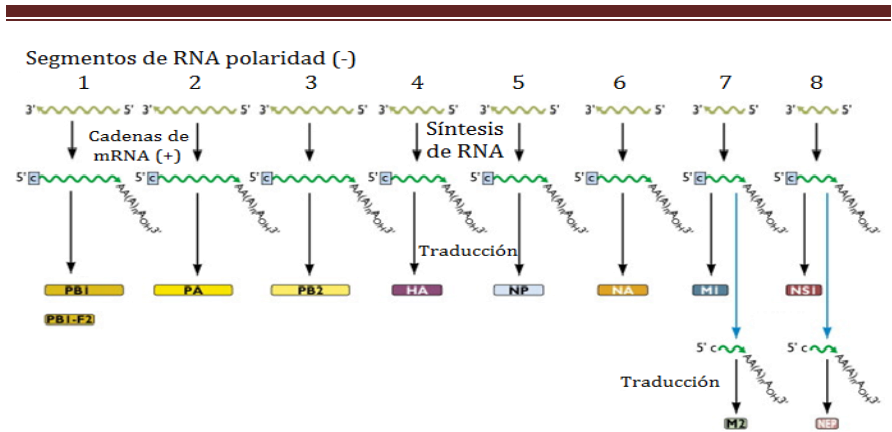


Fig. 4. Genoma del virus de la influenza A. En la figura, los cuadros color azul que contienen la letra C denotan el capuchón 5' que adquiere durante la síntesis de mRNA y los cuadros de colores, las proteínas que son sintetizadas (18).

De cada uno de los 8 segmentos del genoma viral, 6 son mRNAs monocistrónicas (solo tienen un codón de inicio AUG), y son traducidos directamente en las proteínas: HA, NA, NP, PA, PB1 y PB2. Los otros dos contienen marcos de lectura abiertos (ORFs del inglés *Open Reading Frames*) para la síntesis de dos proteínas a partir de cada segmento: M1 y M2 para el segmento 7 y NS1 y NS2 para el segmento 8 (19).

Dentro de la célula infectada se producen tres tipos de RNA: 1) RNA viral (vRNA), de polaridad negativa que se encapsida en los nuevos viriones, 2) RNA complementario (cRNA), que se acumulan en el núcleo de la célula infectada y 3) mRNA, que son también de polaridad positiva pero se

diferencian de los cRNA por ser poliadenilados en su extremo 3' y contener una estructura CAP en el extremo 5' ⁽¹³⁾.

3.7 Proteínas virales

Las proteínas virales (Fig. 5) juegan un papel importante en algunos de los aspectos de restricción de hospedador o patogenésis, incluyendo la habilidad de modular el sistema inmune del hospedador y la capacidad de replicarse eficientemente a bajas temperaturas, entre otras. Las proteínas mejor caracterizadas de acuerdo a su potencial patogénico son la HA, PB1 y PB2, por otro lado, las proteínas NA y M2 han sido muy estudiadas debido a su capacidad de conferir resistencia a los fármacos antivirales en uso ⁽²¹⁾.

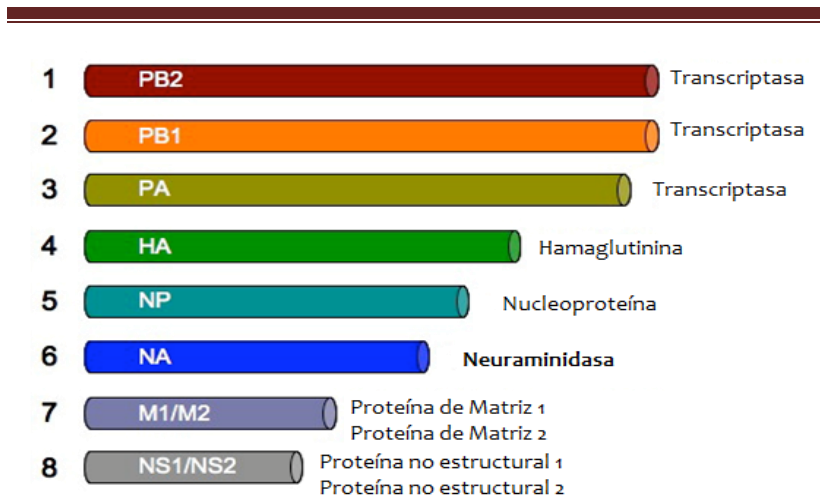


Fig. 5. Proteínas del virus de la influenza. Representación de los ocho segmentos que componen el genoma del virus, enumerados de acuerdo a su tamaño ⁽²⁰⁾.

A continuación se presentan las características más importantes de cada proteína del virus de la influenza.

3.7.1 Subunidades de polimerasa (PB1, PB2 y PA)

Asociado con las ribonucleoproteínas (RNPs) se encuentra el complejo de RNA polimerasa dependiente de RNA, compuesto por tres proteínas denominadas polimerasas ⁽¹⁹⁾. Los tres segmentos mayores del genoma viral -1, 2 y 3-, codifican para las tres subunidades de polimerasa del virus: polimerasa básica 1, polimerasa básica 2 y polimerasa ácida (PB1, PB2 y PA), las cuales actúan en la transcripción del ácido nucleico ⁽¹⁶⁾.

Existe una proteína denominada PB1-F2 (*PB1 Frame 2*), que es un factor de virulencia codificado en un marco de lectura alternativo al correspondiente a PB1 y que se expresa en una porción significativa de cepas del tipo A. Es una proteína pequeña capaz de interactuar con las membranas de las mitocondrias, causando su permeabilidad y la liberación del citocromo C, lo que induce muerte celular. Se ha encontrado que el gen de PB1 de las cepas de la influenza pdm secuenciadas hasta ahora, codifica para una proteína PB1-F2 truncada, debido a mutaciones que generan codones de terminación dentro del marco de lectura ⁽²¹⁾.

3.7.2 Hemaglutinina (HA)

El segmento 4 codifica para la proteína HA. Es una de las dos glicoproteínas de la envoltura y deriva su nombre de poseer la propiedad biológica de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies animales en determinadas condiciones ⁽¹⁶⁾. Esta propiedad ha sido utilizada para la clasificación de los diferentes subtipos del virus ⁽²¹⁾.

La molécula de HA completa es un homotrímero constituido por tres subunidades idénticas unidas en forma no covalente y es la responsable de la unión del virión a los receptores de las células susceptibles. El sitio que se

une a los ácidos siálicos de las células infectadas está formado por una secuencia específica de aminoácidos localizada en el dominio globular de la HA (Fig. 6). Las interacciones atómicas que se establecen entre los residuos de aminoácidos de la HA y los receptores celulares son débiles e involucran la formación de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Sin embargo, la fuerza con que el virus interacciona con la célula está dada por el cooperativismo creado por la unión de múltiples moléculas de hemaglutinina con múltiples receptores ⁽¹⁹⁾.

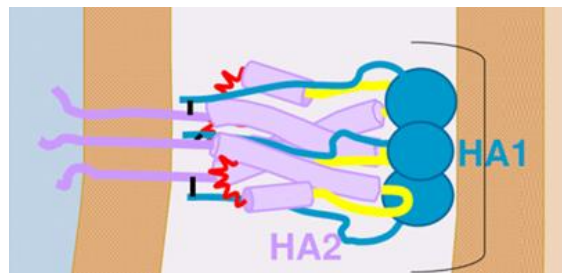


Fig. 6. Hemaglutinina ⁽²⁾. La cadena HA1, es un dominio globular que contiene el sitio de unión al receptor y los determinantes antigénicos, y la cadena HA2 forman una estructura de tallo rica en α -hélice, la cual se extiende al exterior de la membrana ⁽¹⁶⁾.

La HA es también el antígeno principal al que se dirigen los anticuerpos neutralizantes, es sintetizada como un zimógeno HA0, que es activado después de la traducción en dos etapas:

- 1) Activación proteolítica en la arginina 329, para generar dos polipéptidos glucosilados, la HA1 y HA2. Estos polipéptidos están unidos por un puente disulfuro entre la cisteína 14 de la cadena HA1 y la cisteína 137 de HA2 y otros enlaces intercatenarios (Fig. 7) ⁽²¹⁾.
- 2) La liberación de HA2 permite la exposición del péptido de fusión que es el responsable de mediar la fusión de membranas viral y celular. Este corte hace que la infectividad del virus se active ⁽²¹⁾.

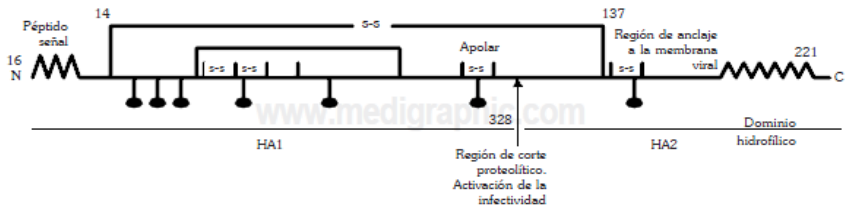


Fig. 7. Estructura primaria de la HA. La proteína debe de ser activada por una proteasa que la corta en la arginina 329, las dos regiones se mantienen unidas por puentes disulfuro. La estructura tiene varios sitios para la unión de carbohidratos representados como círculos ●⁽¹⁷⁾.

3.7.3 Nucleoproteína (NP)

El RNA viral se encuentra asociado a la NP que es codificada por el segmento 5, dicha proteína rodea y envuelve cada segmento de RNA para formar así la ribonucleoproteína (RNP), una estructura de simetría helicoidal a la que se denomina nucleocápside. La NP no contiene carbohidratos y posee la antigenicidad específica de tipo sobre la cual se basa la clasificación de estos virus en A, B y C⁽¹⁹⁾.

3.7.4 Neuraminidasa (NA)

Esta proteína de superficie con aspecto de hongo es codificada por el segmento 6, es una enzima destructora de receptores y representa el 6.7% del total de proteínas del virión, 1:5 en relación con la HA (Fig. 8), su estructura está compuesta de 4 monómeros idénticos cada uno con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa, 10 nm de longitud y 4 nm de

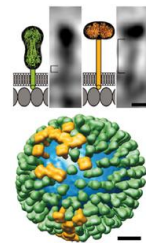


Fig. 8. Distribución de la HA (en verde) y la NA (en amarillo) en la superficie del virus de la influenza, según su disposición espacial, la barra horizontal indica 5 nm⁽¹⁰⁾.

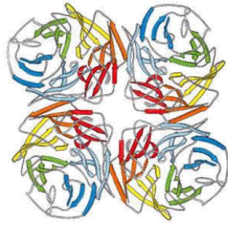


Fig. 9. Estructura tridimensional de la NA. Cada monómero de dobla en 6 hojas β ⁽¹⁴⁾.

diámetro (Fig. 9), unidos por un tallo delgado que posee en su extremo distal una región hidrófoba, por la cual penetra en la envoltura viral. El sitio activo de la NA se ha identificado en el centro de cada cabeza globular del tetrámero, es decir cada bloque tiene un sitio catalítico, por lo que cada espícula posee cuatro sitios activos ^(7, 16, 19).

La NA presenta con gran frecuencia procesos de variabilidad genética por mutaciones y por recombinación. Cuando los virus presentan una mutación no funcional de la NA se aglomeran sobre la superficie de las células infectadas, lo cual sugiere que una de las funciones de esta enzima es remover los residuos de ácido siálico de la superficie de estas células durante la liberación de las partículas virales recién formadas evitando así su autoagregación. Asimismo, la NA puede remover los residuos de ácido siálico de las mucinas del tracto respiratorio, las cuales podrían interferir

con la unión del virus a las células epiteliales superficiales, ayudando así al virus a desplazarse a través de la capa de mucina presente sobre el epitelio respiratorio y alcanzar sus células blanco (Fig. 10) ⁽¹⁹⁾.

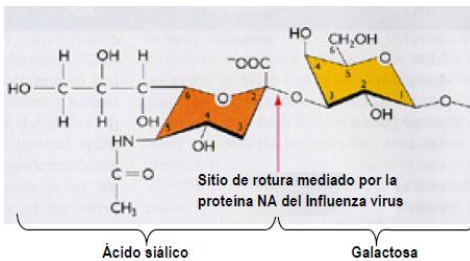


Fig. 10. Sitio del corte del ácido siálico por la NA ⁽⁶⁾.

3.7.5 *Proteínas de matriz y canal iónico (M1 y M2)*

La envoltura lipídica del virus se encuentra cubierta en su interior por la proteína de matriz (M1) codificada por el segmento 7. Esta proteína es uno de los principales componentes de la partícula viral porque proporciona estabilidad al virión, interactúa con los segmentos citoplasmáticos de la HA, la NA, la proteína M2 y con la RNP. *In vitro* inhibe la transcripción e *in vivo* si no se disocia de las RNPs, éstas no pueden ser transportadas al núcleo tras la infección de las células susceptibles del hospedero ⁽¹⁹⁾.

Otra proteína de matriz codificada por el mismo segmento es M2, una proteína integral de membrana cuya estructura corresponde a un homotetrámero que funciona como un canal iónico para permitir la entrada de protones al virus durante el proceso de “desenvoltura” en la replicación viral ⁽¹⁹⁾.

3.7.6 *Proteínas no estructurales 1 y 2 (NS1 y NS2)*

El segmento 8 codifica dos proteínas denominadas no estructurales, NS1 y NS2. La proteína NS1 es la única proteína no estructural codificada por el virus, se encuentra localizada en el núcleo y es expresada tempranamente y en forma abundante en las células infectadas, sin embargo no ha sido detectada en los viriones. Esta proteína es multifuncional y juega un papel importante en la resistencia del virus contra la respuesta antiviral del hospedero durante la infección ya que inhibe el sistema del interferón (IFN α/β) que controla la replicación y patogenicidad del virus. Asimismo, contiene en su estructura una señal de exportación nuclear (NES, *nuclear export signal*) que funciona como mediadora de la exportación de proteínas ⁽¹⁹⁾.

La proteína NS2, conocida inicialmente como una proteína no estructural, se encuentra presente en el virión e interactúa con M1 para exportar la RNP desde el núcleo hasta al citosol por lo que se ha sugerido que sea renombrada como NEP (*nuclear export protein*)⁽¹⁹⁾.

3.8 Variabilidad

Uno de los aspectos únicos y más notables del virus de la influenza es la frecuencia con la cual ocurren cambios en la antigenicidad, lo que le permite escapar a la respuesta inmune del hospedero. Este hecho es más frecuente para el virus del tipo A que para el del tipo B, y no se ha observado para el virus del tipo C. Las variaciones antigénicas involucran fundamentalmente a la HA y a la NA. Se conocen dos tipos de variaciones antigénicas producidas por mecanismos diferentes y que afectan a la HA y NA: las variaciones menores, fluctuaciones antigénicas o deriva antigénica (*drift*) y las variaciones mayores o cambio antigénico (*shift*)^(7,21).

Variaciones menores: Se producen gradualmente cada 2 o 3 años y son el resultado de la selección de mutantes que tienen alteraciones en la secuencia de aminoácidos de HA o NA, causadas por mutaciones puntuales en el vRNA, es decir por cambios en nucleótidos individuales, que ocurren durante la replicación del genoma viral como resultado de los frecuentes errores de copiado de la RNA polimerasa del virus. La infidelidad de la replicación del RNA viral resulta en una tasa de mutación de aproximadamente un cambio por cada genoma copiado (7.3×10^{-5} mutaciones/ nucleótido replicado). Estos cambios, aunque menores, son suficientes para evitar la respuesta inmune del hospedero al no ser reconocidos por los anticuerpos (Fig. 11), es por esta razón que cada año se

revisa la composición de los tipos de virus que se incluirán en la vacuna estacional y es necesario vacunarse anualmente ^(7, 21).

Variaciones mayores: han sido descritas sólo para virus de la influenza A y son cambios en los que se originan virus nuevos para los cuales la población no tiene ningún recuerdo inmunológico (Fig. 12) ⁽⁵⁾. La naturaleza segmentada

del genoma viral facilita que cuando dos virus con diferentes subtipos de HA y NA infectan a un mismo animal, los genes de ambos virus puedan mezclarse y producirse nuevos virus, conocidos como rearreglantes por haber experimentado un “rearreglo de genes” con combinaciones de HA y NA diferentes a las de los virus originales ⁽²¹⁾.

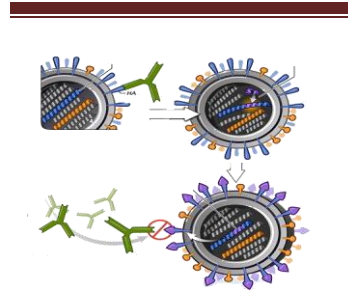


Fig. 11. Esquema que representa una variación menor, suficiente para esquivar la respuesta inmune del hospedero ⁽²²⁾.

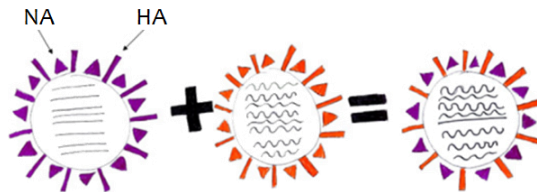


Fig. 12. Esquema que representa una variación mayor, suficiente para dar origen a un virus antigénicamente nuevo ⁽²¹⁾.

Los genomas de RNA de una sola hebra tienen una tasa de mutación aproximadamente un millón de veces mayor que la del DNA de doble hélice.

Las fuentes de variabilidad biológica de genomas segmentados de RNA de una sola hebra, como los del virus A (H1N1) son:

- a) Las bases del RNA, cuya secuencia constituye el mensaje genético del virus, pueden sufrir una serie de reacciones químicas al entrar en contacto con el medio acuoso del interior de una célula cuando ésta es infectada ⁽²³⁾.
- b) La RNA polimerasa lee y replica los RNA que forman el genoma del virus, pero introduce un número considerable de errores que no son corregidos porque carece de la actividad correctora que se observa en las enzimas involucradas en la replicación del DNA ⁽²³⁾.
- c) La recombinación que se produce cuando dos o más virus diferentes infectan una misma célula y se da un intercambio al azar de los segmentos del RNA ⁽²³⁾.
- d) Que se hayan acumulado mutaciones puntuales y que en un momento se manifiesten como variaciones mayores ⁽⁷⁾.

En la figura 13 se representa la variabilidad genética de los virus de la influenza, los virus amarillos y azules representan 2 cepas antigénicamente similares del mismo subtipo que circulan en la población humana. La diversidad genética de las poblaciones circulantes aumenta por mutaciones y reordenamientos. Las flechas grises indican la relación del virus ancestral y sus descendientes. Las marcas blancas en los segmentos indican mutaciones neutrales y las marcas rosas indican mutaciones que afectan las regiones antigénicas de la HA y la NA. Las flechas naranja indican la generación de reordenantes con segmentos de 2 ancestros diferentes. Así como continúen circulando estos virus, la inmunidad contra ellos se va creando en la población del hospedero, representado aquí por la disminución del ancho del cuello de botella. En paralelo, los virus con mutaciones que afectan las regiones antigénicas de la HA y la NA se

acumulan en la población viral. En algún punto se genera una nueva variante antigénica indicada con rosa en el virus. Esta variante es capaz de causar dispersión de la infección y crear un grupo con cepas antigénicamente similares ⁽¹³⁾.

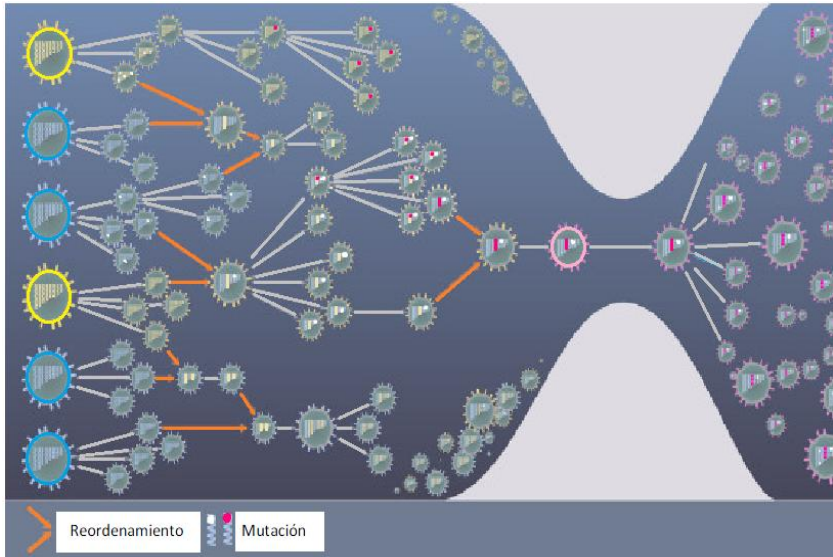


Fig. 13. Variación genética en el virus de la influenza ⁽¹³⁾.

El virus de la influenza A (H1N1) pdm, se originó por un rearreglo entre un virus de cerdo clásico, un virus de aves de Norte América y el virus H3N2 humano, además este virus triple rearreglante, adquirió los genes de la NA y de la proteína M de un virus de cerdo eurasiático tal como se observa en la Fig. 14.

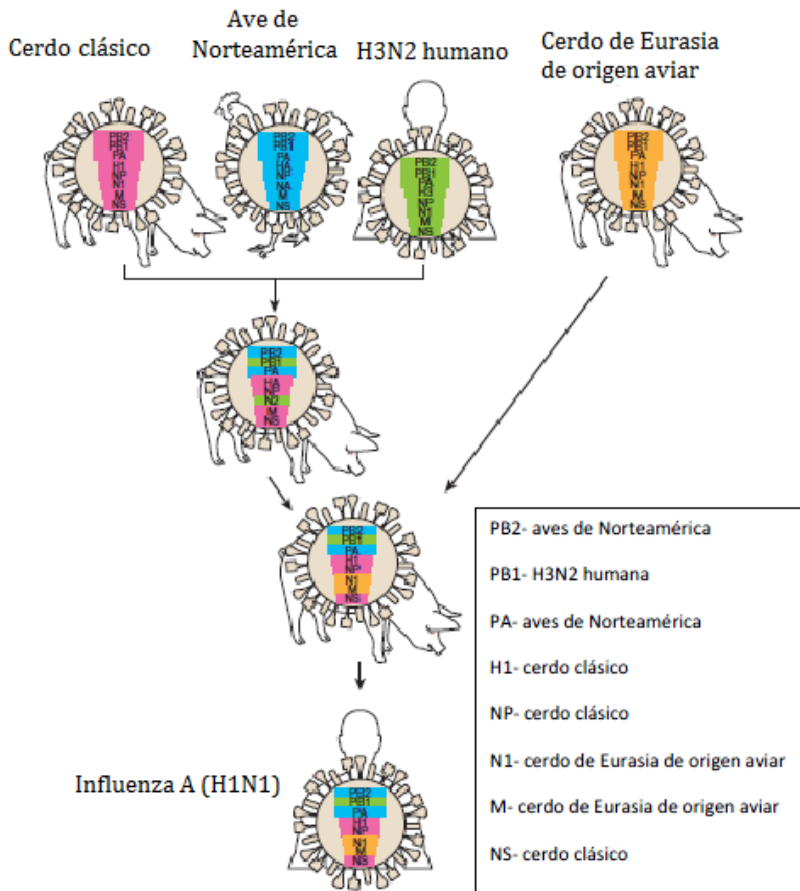


Fig. 14. Origen del virus pandémico ⁽¹³⁾.

3.9 Tropicismo viral

Aunque todos los virus de la influenza reconocen oligosacáridos con un ácido siálico terminal, el tropismo o la especificidad de la HA hacia estas moléculas difiere en relación al tipo de virus del que se esté hablando (aviar, porcino, equino, humano, entre otros) pues influye la clase de enlace glicosídico que presente este ácido con el siguiente carbohidrato al que esté

ligado. Las estructuras más comunes presentan un ácido siálico unido a galactosa (Gal) por un enlace glicosídico tipo alfa que se establece entre el carbono número 2 del ácido siálico y los carbonos 3 ó 6 de la galactosa [SA (α 2-3) Gal y SA (α 2-6) Gal] (34). Estos compuestos se expresan frecuentemente en glicoproteínas y glicolípidos de las células epiteliales respiratorias o intestinales, a las cuales se adhiere el virus. Los virus de la influenza equina y aviar se unen preferentemente al SA (α 2, 3) Gal, los virus humanos se unen preferentemente al SA (α 2, 6) Gal, mientras que los porcinos se unen a SA (α 2, 3) Gal y SA (α 2, 6) Gal, es decir sus células diana pueden fijar HA's de linajes animales diferentes ⁽¹⁹⁾.

3.10 Replicación

Los virus de la influenza pueden producir infecciones productivas o no productivas. Las primeras ocurren cuando el virus se propaga en células permisivas (mucosa respiratoria, células de riñón de mono y mandril o en el epitelio que recubre las cavidades amniótica y alantoidea del embrión de pollo). En las infecciones no productivas, el virus no cumple el ciclo total de replicación y genera virus incompletos o partículas virales no infecciosas ⁽⁷⁾.

Cuando el virus experimenta un ciclo de crecimiento incompleto, se conoce como infección abortiva, lo cual ocurre en diversos tipos celulares. No hay, hasta el momento, una explicación aceptable para la infección abortiva, pero posiblemente se debe a un bloqueo en algún estadio durante el ciclo de replicación normal del virus en donde se produce un gran número de partículas virales con poco RNA. La infección abortiva se ha visto también cuando se inoculan grandes cantidades del virus en células permisivas; este efecto se conoce como "Fenómeno de Von Magnus" ⁽¹⁹⁾.

Cuando el virus completo infecta células permisivas (Fig. 15), el primer paso es la adsorción a la superficie celular:

1) La partícula viral se adhiere a los receptores celulares que contienen AS a través de la HA. El virus se internaliza rápidamente en un endosoma, la HA es cortada en HA1 y HA2 exponiendo el péptido de fusión; 2) la acidificación de la vesícula a pH 5 hace que se exprese esta capacidad de fusión entre las membranas celular y viral, al tiempo que ocurre esto, pasan protones al interior del virión a través de la proteína M2, disociando la proteína M1 de la RNP y liberando la nucleocápside hacia el citoplasma celular; 3) luego múltiples copias se movilizan hasta el núcleo.

4) La síntesis de mRNA requiere estimulación previa de la síntesis de RNA de la célula huésped. La transcripción involucra un proceso denominado *cap snatching* en donde la endonucleasa viral (PB2) corta el casquete de 5-metilguanosa (CAP) más una serie de aproximadamente 10-13 nucleótidos del RNA nuclear (nRNA) del hospedero, y esta estructura es usada como “*primer*” (cebador o iniciador) para la transcripción por la transcriptasa viral (PB1). El suceso final de este proceso es la poliadenilación del extremo 3’.

5) A continuación los mRNAs dejan el núcleo celular y se unen a los ribosomas, iniciándose así el proceso de traducción para la síntesis de las proteínas del virus.

6) Las proteínas HA, NA y M2 que son sintetizadas en el citoplasma sobre la membrana de los polirribosomas, 7) migran hacia la membrana celular, vía retículo endoplásmico donde son glicosiladas y posteriormente son transportadas al complejo de Golgi.

8 y 9) Las PA, PB1, PB2, NP, NS1, NS2 y M1 que son formadas sobre polirribosomas libres en el citoplasma 10) son exportadas hacia dentro del núcleo 11) donde catalizan la síntesis de cRNA, 12) que sirve como molde para la formación de vRNA. 13) Algunas de esas nuevas cadenas sintetizadas de vRNA (-) entran en la vía para la síntesis de mRNA. 14) Las proteínas M1 detienen la síntesis y junto con la proteína NS2 inducen la exportación de la NP que envuelve el material genético de los nuevos viriones hacia la membrana plasmática, 15) sitio donde HA, NA y M2 se han incorporado.

16) El ensamblaje de nuevos viriones dentro de las células infectadas inicia con la unión de la NP al vRNA, recientemente sintetizado para formar RNP. Las RNPs que han salido del núcleo junto con las proteínas M1 y NS2 son incluidas en una envoltura que contiene HA's, NA's y la proteína M2. El ensamble del virión se completa cuando rompe la membrana plasmática, los residuos de ácido siálico son eliminados de la superficie de la célula huésped por acción de la NA viral, para prevenir la readsorción de la progenie viral, y se promueve la liberación del virus, sin embargo no se conoce el proceso por el cual una copia de cada segmento de RNA se empaqueta en cada partícula (7, 18, 19).

Los procesos descritos interfieren con la función normal de las células del hospedero; específicamente, ocurre una síntesis preferencial de los componentes virales a expensas de los componentes de las células del hospedero. El resultado final de todo esto es el cese de la expresión de los genes de la célula del hospedero, por ello, la replicación del virus produce la muerte de la célula infectada. El proceso de liberación de nuevos viriones puede detectarse a las 5-6 horas después de la infección y es máxima a las 7-8 horas ⁽¹⁹⁾.

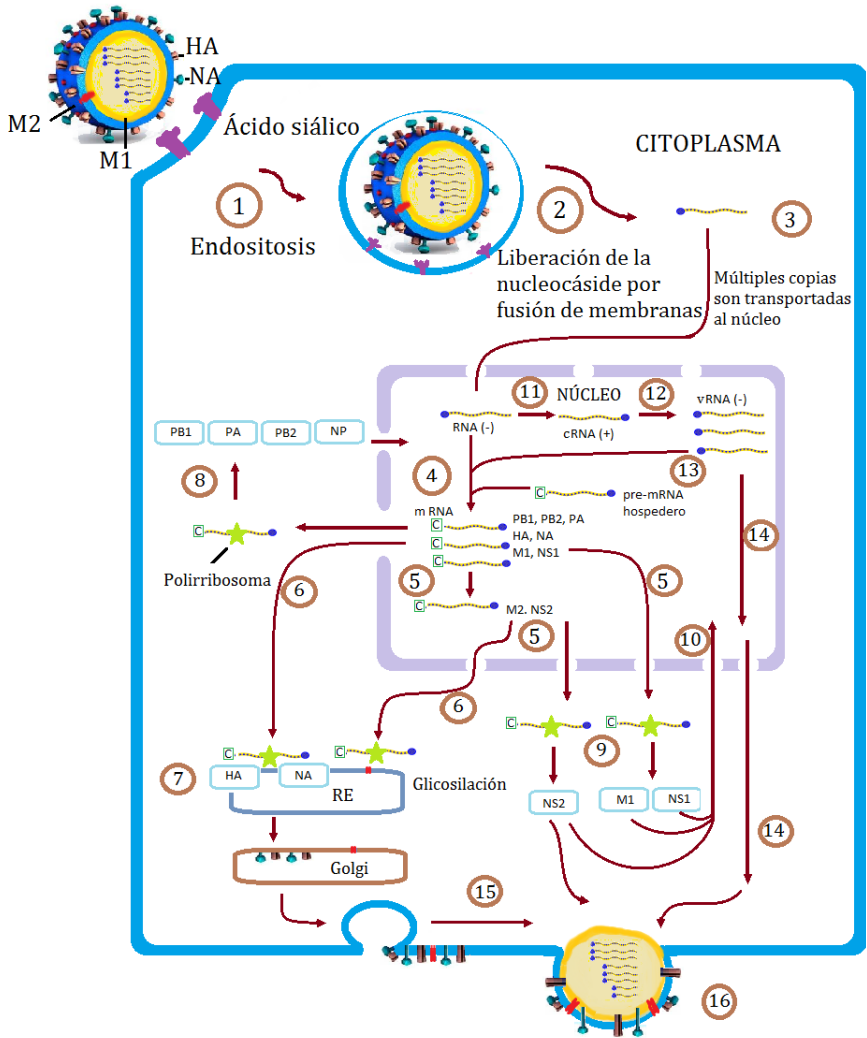


Fig. 15. Replicación del virus de la influenza ⁽¹⁸⁾.

3.11 Reservorio

El virus de la influenza A infecta no sólo al hombre sino también a animales como: porcinos, aves domésticas y silvestres, focas, gatos y caballos. El virus de la influenza equina puede ser transmitido a perros (Fig. 16). Las aves

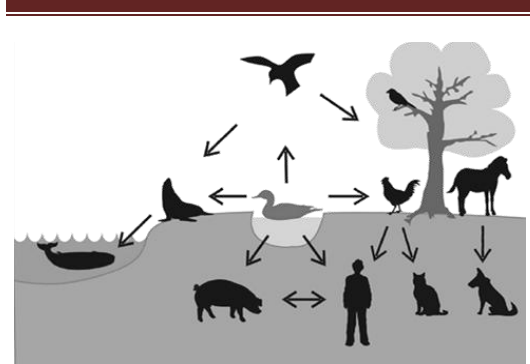


Fig. 16. Animales que infecta el virus de la influenza ⁽¹⁸⁾.

silvestres acuáticas, como patos y gaviotas, entre otras, son el reservorio natural más importante de estos virus. En este tipo de aves circulan todos los subtipos de HA y NA, y se piensa que las aves silvestres son la fuente de los virus que se transmiten a los demás animales, incluyendo aves de corral. Muchos de los subtipos de virus de la influenza A infectan a las aves de manera asintomática o bien causan síntomas moderados; sin embargo, hay infecciones con algunos virus, por ejemplo de los subtipos H5 y H7, que pueden causar enfermedad severa y muerte en algunas especies de aves silvestres y domésticas, tales como pollos y pavos. Los cerdos también son reservorios naturales de algunos subtipos del virus de la influenza A, éstos tienen un importante y complejo rol como reservorios pues tanto los virus de la influenza A aviar como los del subtipo humano pueden infectar y causar enfermedad en cerdos con síntomas similares a los que se presentan en los humanos, tales como: tos, fiebre y secreción nasal y una coinfección en ellos con dos o más virus de diferente linaje, puede dar lugar a la presentación de un nuevo virus por reordenamiento entre los ocho

segmentos del vRNA, asimismo, los porcinos pueden servir de reservorios de cepas antigénicamente viejas y preservarlas en el tiempo ^(6, 21, 24).

3.12 Epidemiología.

En mamíferos, la enfermedad está limitada al aparato respiratorio, mientras que en aves se puede manifestar como infección asintomática o enfermedad sistémica letal. El virus de la influenza C es el menos importante y causa infecciones leves esporádicas no epidémicas, el virus de la influenza B en ocasiones puede producir epidemias, sin embargo, el virus de la influenza A puede causar grandes pandemias. La epidemiología de la gripe, como ocurre con las infecciones virales en general, está influenciada por una compleja interacción de factores que afectan la transmisión del virus de persona a persona. Estos factores son: la virulencia y antigenicidad viral; la inmunidad del hospedero y el ambiente ⁽⁷⁾.

El virus de la influenza A aviar infecta las células del tracto intestinal de las aves, por lo que el virus es excretado en altas concentraciones en las deyecciones de éstas. La transmisión entre aves ocurre primariamente por vía fecal-oral. Debido a que los virus de la influenza A aviar son depositados en las rutas de migración de las aves, diversos mamíferos pueden infectarse, por el contacto directo de las deyecciones aviares depositadas en sus trayectos de migración o por el consumo directo de aves o huevos infectados por sus depredadores naturales ⁽⁶⁾.

En el humano el proceso de infección se da esencialmente por el contacto directo con estas aves, aereolización y/o fómites contaminados con partículas virales. A pesar de que los virus de la influenza aviar A están adaptados para crecer a 40° C (temperatura en el tracto entérico de las

aves), la temperatura de la corriente de aire de las vías aéreas humanas en su porción proximal es inferior hasta llegar a 37° C en las porciones distales, lo cual podría sugerir una transmisión zoonótica limitada; sin embargo la transmisibilidad y capacidad de infectividad parece obedecer un patrón multifactorial, con múltiples hospederos intermedios y escenarios multi-ecosistémicos que podrían favorecer el salto de especies y el reordenamiento viral ⁽⁶⁾.

El virus de la influenza A está asociado con neumonía e infecciones graves en adultos mayores y niños pequeños, infecciones menos graves se asocian con los virus B y C. Los brotes son claramente influenciados por factores estacionales; la gripe aparece con mayor frecuencia en los meses de invierno, las temperaturas bajas y la humedad aumentan la susceptibilidad del epitelio respiratorio a la infección y al mismo tiempo, favorece la supervivencia del virus en las secreciones respiratorias eliminadas. Los niños en edad escolar son los vectores fundamentales de transmisión pues el hacinamiento en las escuelas favorece la propagación del virus. Si bien los brotes epidémicos ocurren en invierno, hay que recordar que los virus de la influenza cocirculan durante todos los meses del año. Cuando inicia el brote de la influenza A y B, se extiende durante 4 a 8 semanas, respectivamente, mientras que el virus C puede extenderse hasta 17 semanas, sugiriendo una mayor endemicidad en la población ⁽⁷⁾.

3.13 Patogenia

El virus de la influenza, primariamente invade la mucosa respiratoria, provocando síntomas sistémicos marcados. En la mayoría de los casos, se transmite de persona a persona por vía aérea (gotitas de saliva o gotitas de Flügge) en un periodo corto, o por contacto con manos o superficies

contaminadas. Luego de que ingresa a las vías respiratorias, alcanza la mucosa o llega directamente a los alvéolos pulmonares. Si las partículas virales no son expulsadas por el reflejo de la tos y escapan a la neutralización por anticuerpos IgA específicos, o es inactivado por sustancias inespecíficas de las secreciones mucosas, pronto se formará una progenie de viriones nuevos que se diseminan a las células adyacentes. La NA disminuye la viscosidad de la película mucosa y favorece la dispersión del virus hacia sectores inferiores del tracto respiratorio. En los estudios histológicos se observa reordenamiento de las células columnares, picnosis, fragmentación nuclear y vacuolización citoplasmática. Al desintegrarse los núcleos se observan cuerpos de inclusión en el citoplasma y las cilias desaparecen. En definitiva, la infección termina destruyendo las células que infecta ⁽⁷⁾.

3.14 Manifestaciones clínicas

La infección por el virus de la influenza A (H1N1) pdm se caracteriza por presentar una morbilidad elevada y una mortalidad baja. El periodo de incubación de la enfermedad en el ser humano varía entre 1 y 7 días, y depende de la concentración del inoculo viral y de su capacidad replicativa. Este virus infecta a personas desde los 3 meses a los 81 años, pero el 40 % de la población afectada tiene entre 10 y 18 años de edad, lo que denota un comportamiento inusual en esta infección ⁽⁶⁾.

Dependiendo del grado de inmunidad a la cepa circulante, el cuadro clínico puede ser asintomático, presentándose en la mayoría de los casos infecciones leves o inaparentes; o sintomáticos e incluso grave en pacientes predispuestos por alguna patología crónica. La influenza se presenta abrupta o súbitamente con síntomas sistémicos y comunes que incluyen

fiebre alta (superior a 38° C), malestar general, escalofríos, cefalea, mialgias, postración y síntomas respiratorios como: tos seca, estornudos, secreción nasal abundante, enrojecimiento de la conjuntiva, dolor de garganta y anorexia. La fiebre es el signo más prominente y los signos sistémicos desaparecen generalmente después de 3 a 5 días, pero los signos respiratorios se incrementan con el aumento de la tos seca que cambia frecuentemente a productiva. La recuperación es total, en un periodo de 2 a 4 semanas ^(23,25).

3.15 Respuesta inmune

El virus de la influenza causa una infección aguda en el hospedador e inicia una cascada de reacciones inmunes activando así una respuesta humoral y celular ⁽¹³⁾.

Las proteínas de superficie son las de mayor importancia en la respuesta humoral, y las proteínas internas predominan en la respuesta celular. Los anticuerpos de las mucosas (IgA) y del suero (IgG) generados frente a la molécula de la HA neutralizan la infectividad del virus y son la primera barrera de resistencia a la infección por bloqueo del dominio de adhesión en la subunidad HA1 y duran de por vida a títulos variables. La respuesta de las IgG a la HA es subtipo específica, pero por la acumulación de mutaciones puntuales el virus escapa a la destrucción por anticuerpos ⁽¹³⁾.

La respuesta inmunitaria celular está mediada por células T CD4+ que colaboran en la producción de anticuerpos por células B y a la proliferación de linfocitos T clase I, y por células T CD8+ dirigidas a los antígenos de la NP y de la M. Los virus de la influenza son sensibles a las propiedades antivirales del IFN, el cual contribuye a la recuperación de la infección ⁽¹³⁾.

3.16 Diagnóstico

La muestra adecuada para el diagnóstico es la que se obtiene a través del hisopado nasal y faríngeo, aspirado nasofaríngeo, lavado bronqueoloalveolar o aspirado traqueal. Los hisopados se introducen en un criovial que contiene un medio de transporte viral. El transporte de la muestra se hace manteniendo una cadena en frío (2-8° C) ⁽⁶⁾.

Después de los primeros casos de personas infectadas con el virus de la influenza A (H1N1) pdm, en México y EEUU, la OMS recomendó para el diagnóstico, una prueba de RT-PCR en tiempo real, que utiliza iniciadores específicos para el virus de la influenza A (H1N1) pdm diseñada en el CDC. Otro de los métodos para la confirmación del diagnóstico es el aislamiento viral de cultivo celular MDCK que permite identificar el tipo de virus respiratorio ⁽⁶⁾. Actualmente se dispone también de pruebas rápidas del tipo de cromatografía para la detección rápida y cualitativa del antígeno de la influenza A (H1N1) ⁽²⁶⁾.

3.17 Profilaxis

El CDC recomienda dos mecanismos preventivos para disminuir el impacto de la gripe: inmunoprofilaxis y quimioprofilaxis. La vacunación es sin duda la medida más efectiva. La vacuna está elaborada a partir de virus vivos cultivados en huevos embrionados de gallina e inactivados por formalina. Las vacunas se reformulan en cada primavera para que contengan los antígenos virales que circularon ese año (Fig. 17). La vacunación se recomienda especialmente para personas mayores de 65 años, pacientes portadores de insuficiencia cardíaca, EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), bronquíticos crónicos, diabéticos, asmáticos, personal

de salud, embarazadas en período epidémico, en el segundo o tercer trimestre. En cuanto a la vacunación de pacientes con VIH, debido a la poca información existente, algunos reportes no sugieren el uso de virus vivos independientemente del recuento de linfocitos CD4 y está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad al huevo y los que estén cursando un cuadro febril (7).

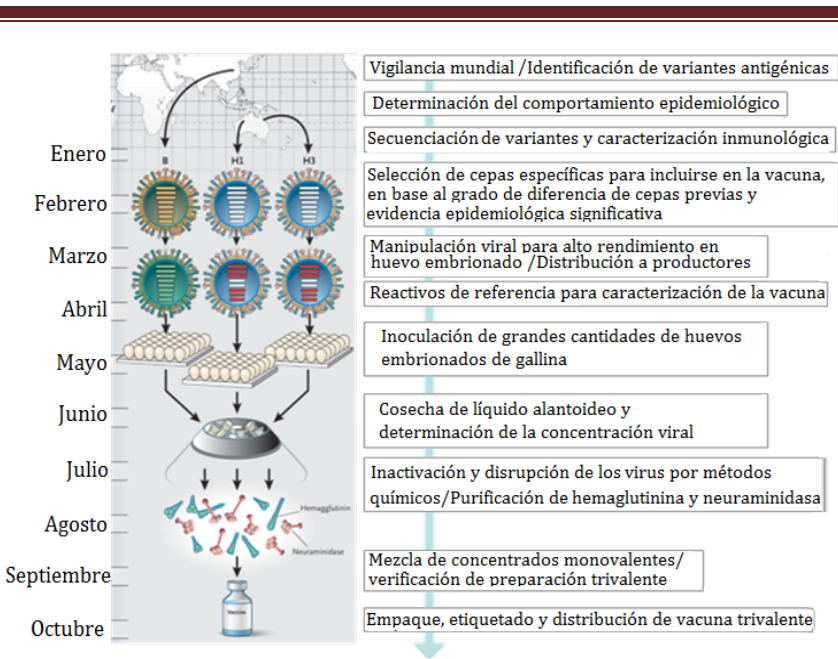


Fig. 17. Tiempo necesario para el proceso de la producción de la vacuna estacional (22).

3.18 Tratamiento con fármacos antivirales

El uso de agentes antivirales para la infección con influenza recibe atención especial por la amenaza de una infección con influenza aviar ya que estos virus tienen un enorme potencial de propagación y como reserva para su

aplicación ante una pandemia. En general el desarrollo de fármacos para la influenza ha sido lento y de alcance restringido en comparación a otras infecciones virales ⁽²⁷⁾. Son dos las clases de fármacos que están disponibles para el tratamiento de la infección por influenza A: los inhibidores del canal iónico M2: amantadina y rimantadina y los inhibidores de la neuraminidasa: oseltamivir y zanamivir ⁽¹³⁾.

La amantadina y rimantadina son derivados químicos de los adamantanos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de infecciones por virus de la influenza tipo A. Estos fármacos bloquean la actividad de canal iónico de la proteína M2 evitando el cambio de pH para la liberación del RNA viral al citoplasma y la posterior replicación del virus (Fig. 18) ⁽¹³⁾.

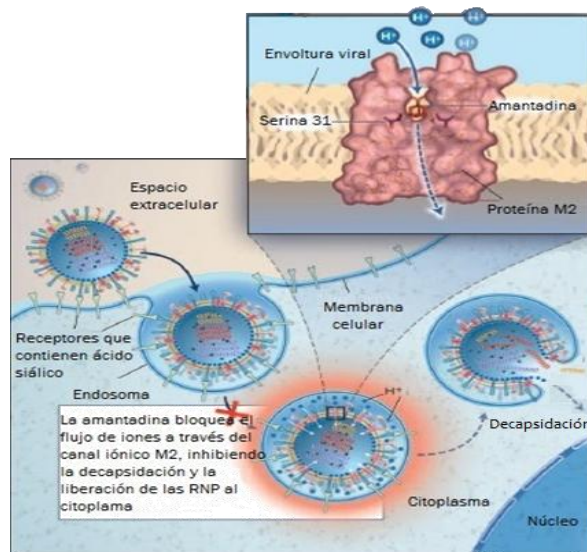


Fig. 18. Mecanismo de acción de los inhibidores de la proteína M2 ⁽²⁸⁾.

Sin embargo, los virus de la influenza A (H1N1) pdm son resistentes a su acción, en la mayoría de los casos, por un único cambio aminoacídico (S31N) en la proteína M2 ⁽¹³⁾. El reemplazo de la serina por un aminoácido más voluminoso como la asparagina lleva a la pérdida de la unión a amantadina y a la restauración de la función de M2 ⁽²⁸⁾.

Inhibidores de la Neuraminidasa.

Desde 1999 existen de forma comercial dos fármacos: zanamivir vía inhalatoria (Relenza®) y oseltamivir vía oral (Tamiflu®) que han demostrado ser útiles en la prevención y tratamiento de las infecciones del virus de la influenza.

Los inhibidores de la NA (INA's) fueron diseñados para limitar la infección bloqueando el sitio activo de la enzima y evitando así la dispersión de los nuevos viriones formados (Fig. 19) ⁽¹³⁾.

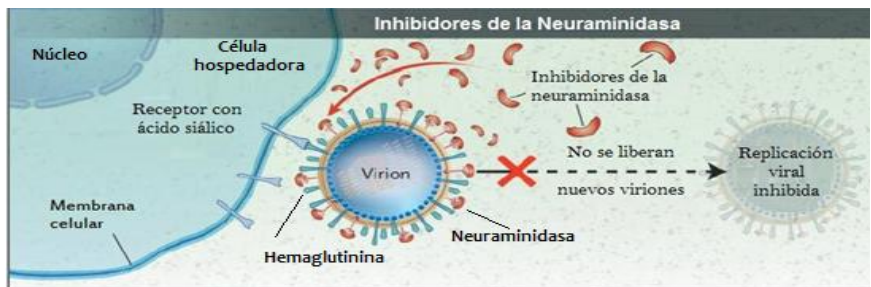


Fig. 19. Mecanismo de acción de los Inhibidores de la NA ⁽²⁹⁾.

No obstante cuando la concentración del fármaco es baja, se podría bloquear la replicación viral de manera parcial y se potenciaría el riesgo para la aparición de cepas resistentes al promover un ambiente propicio ⁽¹³⁾.

Además existen mutaciones en la NA que son responsables de generar resistencia al fármaco oseltamivir y que varían de acuerdo al subtipo de NA, por ejemplo: en los virus de la influenza A (H3N2), las mutaciones que generan dicha resistencia ocurren principalmente en las posiciones E119 y R292, mientras que en los virus A (H1N1) pdm las mutaciones ocurren en la posición H275 ⁽¹³⁾, sin embargo otros residuos también están involucrados en la resistencia a estos antivirales: V116, I117, E119, Q136, K150, D151, D198, I223, y N295 ⁽⁴⁾.

3.19 Secuenciación del DNA

En 1977 se reportaron dos protocolos que conseguían obtener la secuencia o el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un fragmento del DNA.

El primer método fue el de Maxam y Gilbert o método de degradación química. Este método emplea una cadena molde del DNA marcada con ³²P en su extremo 5' y se basa en la utilización de reactivos que cortan específicamente en un residuo que ha sido modificado, de este modo se obtienen fragmentos marcados radioactivamente que terminan en diferentes posiciones y que son separados por electroforesis en base a su tamaño. Conociendo el nucleótido en el que se realizaron los cortes, se puede inferir la secuencia de la molécula original en una autoradiografía (Fig. 20) ⁽³⁰⁾.

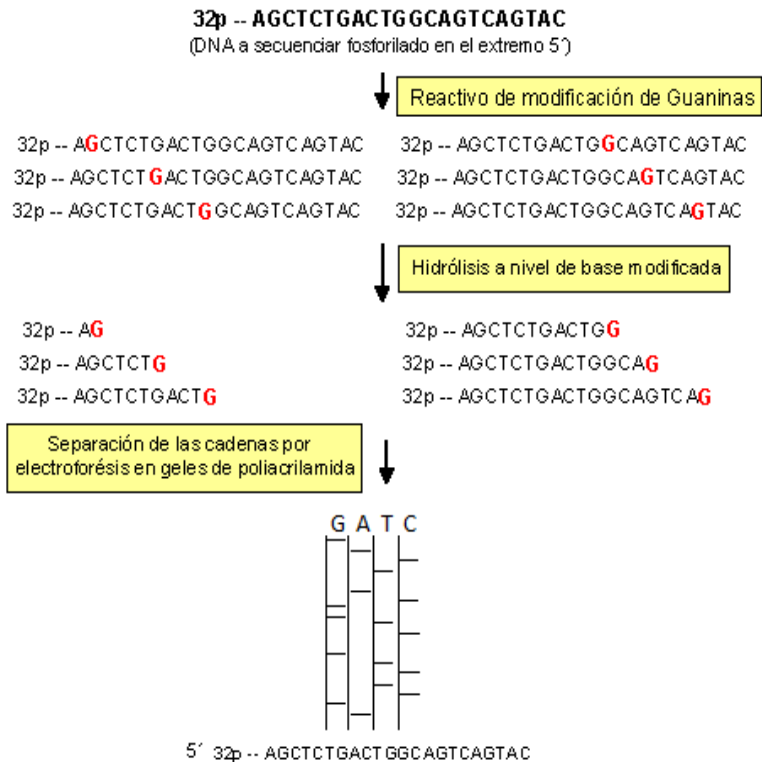


Fig. 20. Método de Maxam y Gilbert. Ejemplo con Guanina ⁽³¹⁾.

El segundo método que se reportó es conocido como método didesoxi de Sanger o método enzimático de terminación de cadena. En este método se emplea un templado de DNA de cadena sencilla y una DNA polimerasa T1 para la síntesis de la hebra complementaria a partir de un iniciador marcado radioactivamente, lo que permite leer la secuencia en una autoradiografía. Este método se basa en la utilización de 2',3'dideoxinucleótidos (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddTTP y ddGTP) los cuales compiten con sus homólogos

(dATP, dCTP, dTTP y dGTP) para incorporarse en la cadena de DNA que se está sintetizando y que detienen la polimerización en el punto en el que se incorporan, generando fragmentos de diferente tamaño con una base de diferencia, que son separados mediante una electroforesis (Fig. 21) ⁽³³⁾.

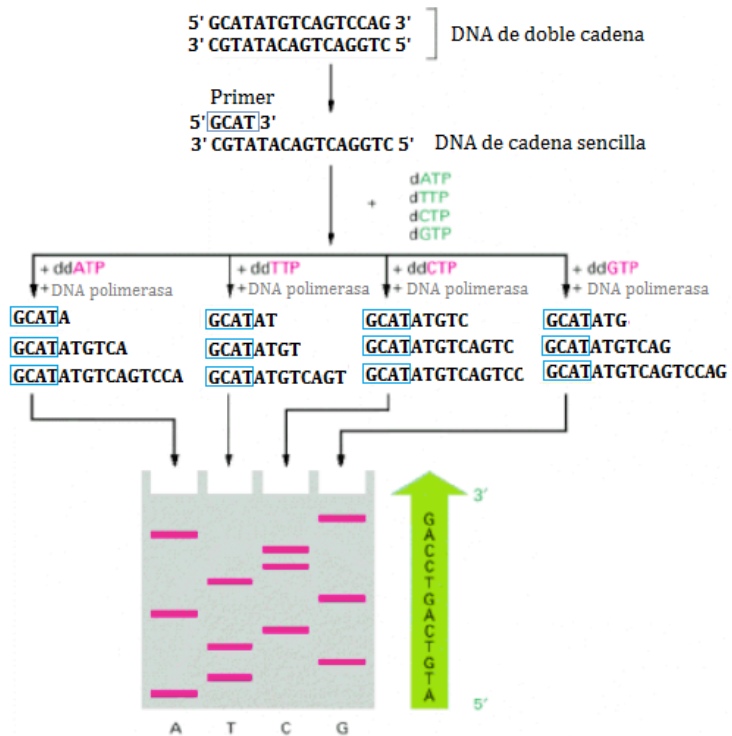


Fig. 21. Método de Sanger ⁽³²⁾.

Aunque en los dos casos, la secuencia de la molécula se determinaba en una autoradiografía por las diferencias entre los tamaños de los fragmentos generados, el método de Sanger hoy en día es el más utilizado sobre todo porque permitió la automatización del método de secuenciación. Con el

tiempo dejaron de emplearse los iniciadores marcados radioactivamente y se comenzaron a utilizar ddNTPs marcados con un fluoróforo distinto cada uno, lo que permitió que la reacción se llevara a cabo en un mismo tubo, además la implementación de un sistema de detección de fluorescencia permitió que la lectura de la secuencia se llevara a cabo al mismo tiempo que la electroforesis (Fig. 22) ⁽³³⁾.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA

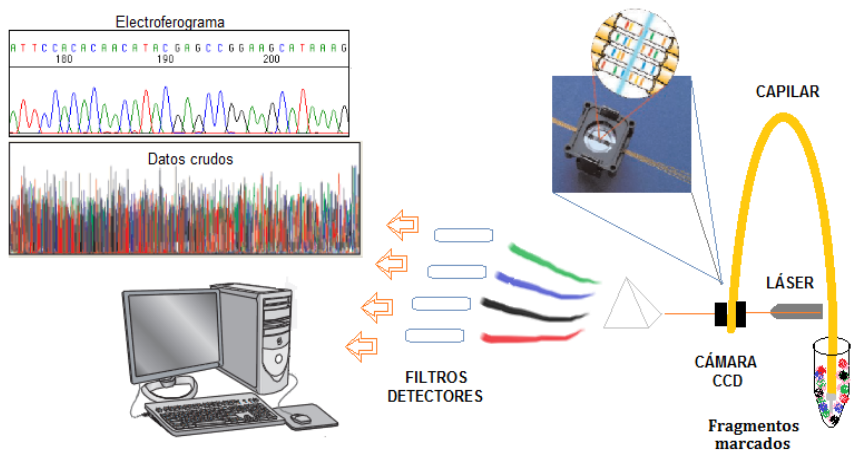


Fig. 22. En la secuenciación automatizada los fragmentos del DNA de nueva síntesis migran electroforéticamente en función de su tamaño a través de un arreglo capilar, cada vez que un fragmento pase por la cámara CCD (del inglés *Charge Couple Device*) o bloque de la celda de detección, un láser de argón incidirá en él y emitirá una señal de fluorescencia que será difractada por un prisma. Los filtros detectores captarán la señal de fluorescencia difractada y esta señal será transformada por un software que se encarga de coleccionar los datos y los transforma a datos crudos. Posteriormente un software de análisis traducirá los datos crudos a electroferogramas ⁽³⁴⁾.

3.20 Vigilancia epidemiológica

En México desde 1994 la influenza es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica y de notificación obligatoria e inmediata de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2 ⁽¹⁾.

El InDRE, como Centro Nacional de Referencia para la Influenza ante la OMS, realiza la vigilancia epidemiológica de los marcadores moleculares que confieren resistencia a oseltamivir en el virus de la influenza A (H1N1) pdm ⁽⁴⁾ principalmente del marcador H275Y; una de las aplicaciones de la secuenciación automatizada útil en esta tarea es la obtención de secuencias completas del gen de la NA.

Como parte de esta vigilancia, en 2012 el Laboratorio de Genoma de Patógenos (GNMP) del InDRE, analizó 16 secuencias completas del gen de la NA del virus de la influenza A (H1N1) pdm. En este análisis no se detectaron los marcadores asociados resistencia antiviral (V116, I117, E119, Q136, K150, D151, D198, I223, H275 y N295) excepto en tres muestras, donde se determinó únicamente la mutación H275Y, marcador característico de esta resistencia. Es importante destacar que las secuencias analizadas presentaron mutaciones con respecto a la cepa de referencia NA/H1N1/Human/2009/California07, en aminoácidos diferentes a los analizados.

En la tabla 4 se observan las mutaciones halladas, 3 se encuentran presentes de manera aislada (T9I, S82P, G354D) y 6 aparecen de forma reiterada en todas las muestras (G41R, N44S, V106I, V241I, N248D y N369K), de éstas se sabe que las mutaciones V106I y N248D son características de estacionalidad y son comunes dentro del brote del 2009 ⁽⁵⁾.

Tabla 4. Mutaciones encontradas en 16 secuencias completas del gen de la NA durante el 2012.

Muestra	Mes	T9I	G41R	N44S	S82P	V106I	V241I	N248D	H275Y	G354D	N369K	Mutaciones
994	Ene		*	*		*	*	*			*	6
1393	Ene		*	*		*	*	*			*	6
1474	Ene		*	*		*	*	*	*		*	7
1604	Ene		*	*		*	*	*			*	6
1627	Ene		*	*		*	*	*			*	6
1847	Ene		*	*		*	*	*			*	6
1898	Ene		*	*		*	*	*			*	6
2770	Ene		*	*		*	*	*			*	6
3021	Ene		*	*		*	*	*			*	6
3326	Ene		*	*		*	*	*			*	6
4901	Feb		*	*		*	*	*		*	*	7
5551	Feb		*	*		*	*	*			*	6
5726	Feb		*	*		*	*	*	*		*	7
6023	Feb		*	*		*	*	*	*		*	7
6301	Mar		*	*	*	*	*	*			*	7
6607	Mar	*	*	*		*	*	*			*	7

* - Indica la presencia de la mutación señalada en cada columna.

En negritas y sombreadas resaltan las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K.

4. JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de GNMP del InDRE, realiza la vigilancia epidemiológica de la mutación H275Y que confiere resistencia a oseltamivir mediante la caracterización molecular de este marcador (3). Como resultado de esta vigilancia se detectaron también las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K en las cepas circulantes durante el período 2011-2012 (5). Sabiendo que la variabilidad genética es una de las principales características biológicas del virus de la influenza y que el gen de la NA es uno de los que varían más rápidamente que el resto de los genes, entonces resulta importante conocer el origen en el tiempo de estas mutaciones.

5. HIPÓTESIS

Si se analizan diversas secuencias del virus de la influenza A (H1N1) pdm circulantes durante el 2009 al 2011, buscando los cambios G41R, N44S, V241I y N369K en la NA, entonces se conocerá si dichos cambios son marcadores comunes presentes desde la pandemia del 2009 o surgieron como mutaciones puntuales, encontrando su aparición en el tiempo.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K en el gen de la NA del virus de la influenza A (H1N1) pdm a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo de los años 2009-2011 mediante secuenciación capilar y análisis bioinformático para conocer su origen en el tiempo.

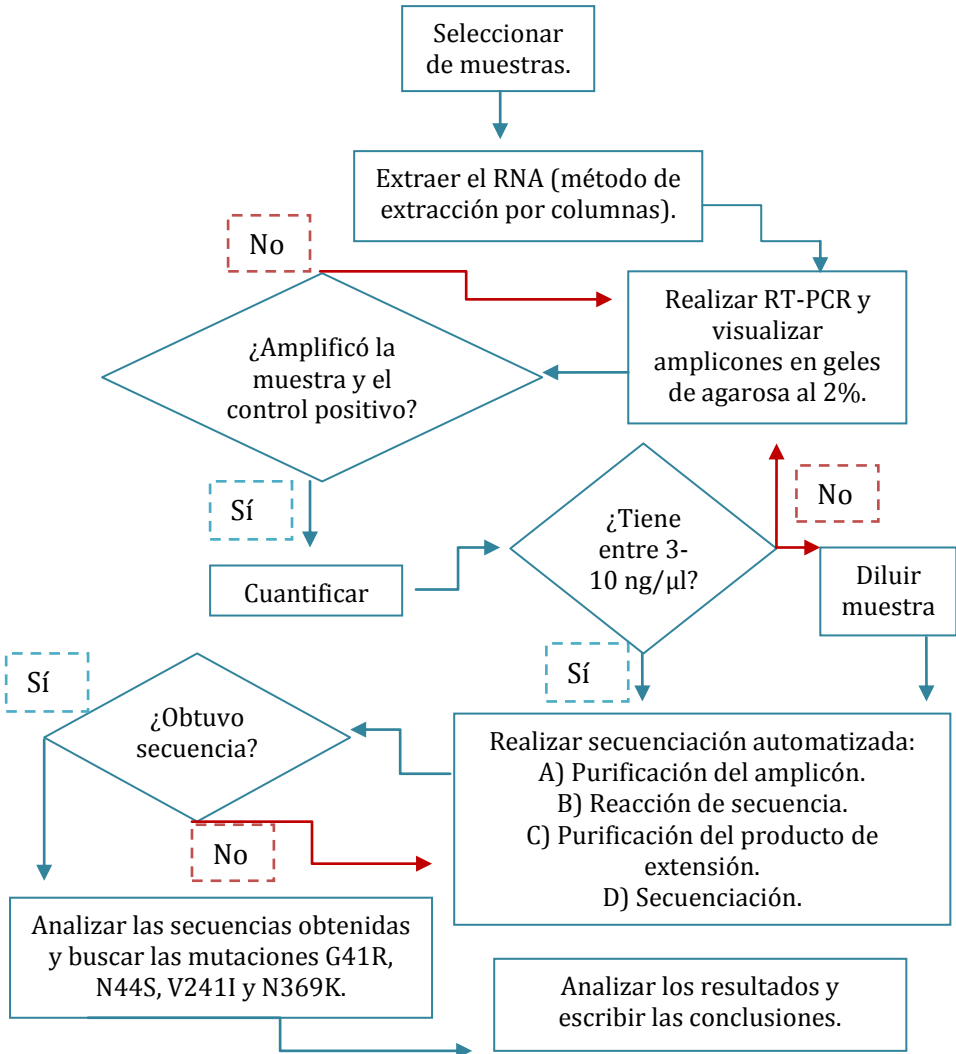
Objetivos particulares

- Obtener el RNA del virus de la influenza A (H1N1) pdm de 60 muestras clínicas de los años 2009-2011 mediante el método de extracción en columna para amplificar por RT-PCR, 3 segmentos que flanquean las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K.
- Obtener las secuencias por secuenciación capilar para el rastreo de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K.
- Analizar las secuencias obtenidas para la búsqueda de las mutaciones utilizando programas bioinformáticos.

7. METODOLOGÍA

La investigación retrospectiva de la aparición en el tiempo de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K, se realizó en base al siguiente diagrama de flujo:

7.1 Diagrama de flujo



7.2 Selección de muestras

Se seleccionaron 60 muestras de hisopado nasofaríngeo positivas para influenza A (H1N1) por PCR tiempo real, correspondientes a los años 2009 a 2011 (20 muestras por año), proporcionadas por el banco de muestras del Laboratorio de Virus Respiratorios del InDRE.

7.3 Extracción de RNA

El RNA viral se obtuvo a partir de 140 μL de muestra clínica empleando el Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN) de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Fig. 23).

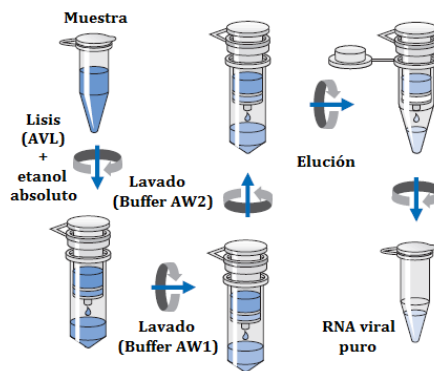


Fig. 23. Extracción de RNA (35).

7.4 Diseño de iniciadores

Con la finalidad de amplificar los sitios que flanquean las posiciones 123 y 132, que corresponden a las regiones donde se presentan las mutaciones G41R y N44S se diseñó un par de iniciadores con el programa Primer3Plus y

para las posiciones 723 y 1107 donde se presentan las mutaciones V241I y N369K se utilizaron dos pares de iniciadores tomados de la literatura ⁽³⁶⁾.

Secuencia de los iniciadores empleados:

Para **G41R y N44S**

>F34^a 5'- TCGGTCTGTATGACAATTGGAATGGCT-3'

>R242^a 5'- TGCTGCTGGACAGTCAGTGGT-3'

Para **V241I**

>F524^b 5' - ARTCAGTYGCTTGGTCAGCAAG-3'

>R908^b 5'- CATGSRTC GAATCGACCYTG-3'

Para **N369K**

>F780^b 5'- GGGGAAGATTGTYAAATCAGTYGA-3'

>R1273^b 5'- CATAAGYCCTTGRTTCTGGGTWG-3'

F: forward primer (iniciador hacia adelante); R: Reverse primer (iniciador reverso). ^aSecuencia de iniciadores diseñados para el presente trabajo, ^bSecuencia de iniciadores extraídos de la literatura.

De este modo se obtuvo el mapa de amplificación del gen de la NA en el que se muestran los segmentos (denominados X, Y y Z) que flanquean los sitios donde se presentan dichas mutaciones (Fig. 24).

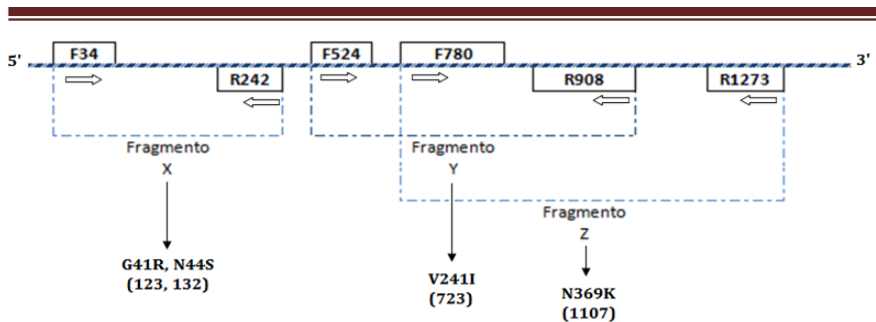


Fig. 24. Mapa de amplificación de la NA.

7.5 Amplificación

Se realizó una RT-PCR con 5µL del extracto de RNA utilizando el estuche SuperScrip III Platimun One-Step RT-PCR System (Invitrogen) y el termociclador Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems).

Para la amplificación de los extractos, se emplearon las cantidades de los reactivos del kit de RT-PCR descritas en la tabla 5 y el programa usado se observa en la figura 25. Como control positivo de la reacción se empleó un extracto proveniente de un cultivo del virus de influenza (H1N1) pdm y como control negativo agua grado biología molecular.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la RT-PCR.

Reactivos por muestra	Vol./rxn (µL)
Agua	6
RT/Taq	0.5
Buffer 2X	12.5
Primers F/R	0.5 de c/u

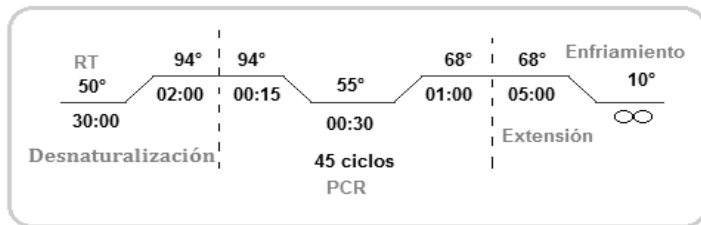


Fig. 25. Programa utilizado para la RT-PCR.

7.6 Electroforesis

Se realizó la separación electroforética de los productos de amplificación (amplicones) en una cámara de electroforesis horizontal a 110V, colocando

5 μL de producto mezclados con 2 μL del colorante Naranja de Acridina en geles de agarosa al 2% que contenían 1 μL de GelStar $\text{\textcircled{R}}$ como agente fluorescente en una solución tampón TBE 1X (0,0089 M Tris borato, 0.002 M EDTA, pH 8). Se incluyó el marcador de peso molecular Phi X174 y las bandas obtenidas se observaron con luz UV en el fotodocumentador BIO-RAD Molecular Imager $\text{\textcircled{R}}$ Gel Doc TM XR con el software Quantity One.

7.7 Cuantificación

La cuantificación se realizó cargando 1 μL de cada amplicon en chips Agilent DNA 1000 preparados con los reactivos del kit Agilent DNA según las especificaciones del fabricante. Este sistema se introdujo en el Bionalizador Agilent 2100 para obtener el tamaño y cuantificación de cada amplicon así como una imagen en formato digital del corrimiento electroforético.

7.8 Secuenciación automática en el secuenciador 3130xl

- a) **Purificación enzimática.** Se realizó una purificación enzimática de los amplicones obtenidos agregando 0.5 μL de reactivo ExoSAP-IT $\text{\textcircled{R}}$ a cada 5 μL de muestra, se mezclaron con un vórtex y se incubaron en un termociclador Gene Amp $\text{\textcircled{R}}$ PCR system 9700 a 37 $^{\circ}$ C por 15 min. para que las enzimas se activen y posteriormente a 80 $^{\circ}$ C durante 15 min para su inactivación.

- b) **Reacción de secuenciación.** La reacción de secuenciación se realizó con el kit Big Dye Terminator 3.1v Cycle Sequencing $\text{\textcircled{R}}$ en un termociclador Gene Amp $\text{\textcircled{R}}$ PCR system 9700 utilizando las cantidades de los componentes de la tabla 6 y el programa de la Fig. 26.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la secuenciación

Componente	Cantidad (μL)
Buffer 5X	3
BigDye	2
*Primer F o R	1
DNA	Requerido
Agua	Cbp. 20

*La reacción se realiza con un solo primer por lo que se hacen dos reacciones independientes por cada muestra, una con el primer F y otra con el primer R.

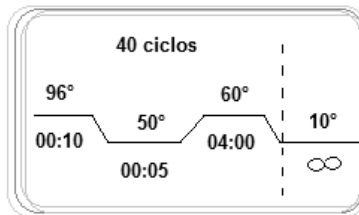


Fig. 26. Programa para la reacción de secuenciación.

c) Purificación en columnas de los productos de extensión. Los productos de extensión fueron purificados en columnas DyeEx 2.0 (QIAGEN) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Fig. 27).

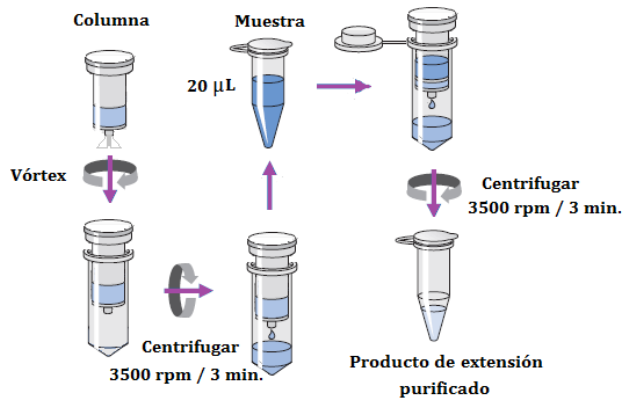


Fig. 27. Purificación de los productos de extensión

d) **Electroforesis capilar.** Una vez purificados los productos de extensión, se llevó a cabo la electroforesis capilar en el secuenciador ABI 3130xl. El software de captura de datos traduce las señales de fluorescencia emitida por los fragmentos marcados a datos crudos y el software de análisis traduce estos datos ofreciendo la lectura de la secuencia en forma de electroferogramas.

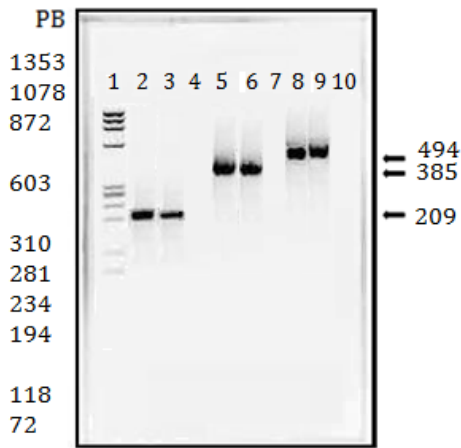
7.1 Análisis de secuencias.

a) *Edición y alineación.* Los electroferogramas se editaron con ayuda de la herramienta Chromas comparando cada pico con el nucleótido que le fue asignado por el software de análisis en los dos electroferogramas obtenidos por muestra (uno con el primer F y otro con el primer R). Además se utilizó la herramienta bioinformática BLASTn para corroborar que las secuencias obtenidas corresponden al gen de la NA de influenza A (H1N1) pdm.

b) *Búsqueda de mutaciones.* Se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia de la cepa de referencia NA/H1N1/Human/2009/California07 mediante un alineamiento local realizado con la base de datos FluSurver.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para conocer el origen en el tiempo de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K, se trabajaron 60 muestras de hisopado nasofaríngeo, de las cuales se logró la amplificación del material genético integro de 15 muestras. En la figura 28 se muestra el corrimiento electroforético de los productos de PCR de los fragmentos X, Y y Z de una de éstas muestras.



Una vez que se comprobó la amplificación en geles de agarosa de los tres segmentos de cada muestra, los amplicones se cuantificaron en el bioanalizador. En la figura 29 se observa una imagen digital del corrimiento electroforético de los amplicones donde por la sensibilidad del método se puede verificar su calidad (No se observan productos inespecíficos).

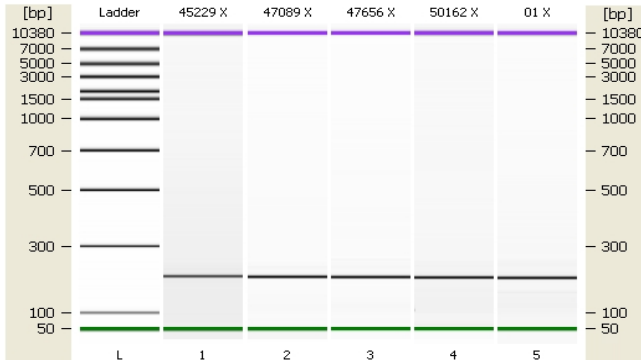


Fig. 29. Electroforesis de los fragmentos X de diferentes muestras en el Bioanalizador Agilent 2100.

Cuando la OMS anunció que una pandemia de gripe por influenza A (H1N1) estaba en marcha, la vigilancia epidemiológica de este virus adquirió gran relevancia. Los datos derivados de ella anunciaron que en el periodo post-pandémico, hubo un predominio mundial de influenza estacional A (H3N2) y de influenza B, sin embargo en la temporada 2011-2012 en México y Centroamérica el subtipo predominante fue el A (H1N1) pdm con una circulación limitada de los virus A (H3N2) y el virus B ⁽³⁷⁾.

Con el seguimiento epidemiológico del virus pandémico se pudieron encontrar diversas mutaciones en cepas circulantes del 2012, donde las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K presentaron particular interés debido a que estaban presentes en todas las muestras y no se tenían reportes de ellas anteriores al 2010-2011. Para tener un panorama más amplio de la vigilancia epidemiológica de los marcadores G41R, N44S, V241I y N369K en el país, además de las 15 muestras trabajadas se emplearon 15 secuencias provenientes de muestras de hisopado nasofaríngeo del virus de la influenza A (H1N1) pdm (7 y 8 secuencias del 2009 y 2011 respectivamente), obtenidas del banco de datos GenBank. Además, se incluyeron las 16 secuencias obtenidas por el Laboratorio de GNMP en 2012 y una del 2011 (Tabla 7 y Fig. 30).

Tabla 7. Secuencias incluidas en el análisis bioinformático y su procedencia.

A n o	Muestra	Estado de procedencia
	13555*	De México
	13551*	De México
	13495*	De México
	13547*	De México
2009	13494*	De México
	4487*	De México
	4114*	De México
	37381	Tlaxcala
	45229	DF
	47089	DF
	47656	Tlaxcala
	50162	Michoacán
	52057	Durango
2010	01	DF
	182	San Luis Potosí
2011	201	DF
	705	Tlaxcala
	1779	DF
2011	1155*	Nuevo León
	1945*	Chihuahua
	1946*	Chihuahua
	2194*	Chihuahua
	2202*	Chihuahua
	2419*	Chihuahua

A n o	Muestra	Estado de procedencia
	2425*	Chihuahua
	3740*	De México
2010	3760	Puebla
	3752**	Sonora
2011	3753	Tlaxcala
	3754	Tlaxcala
	3766	Puebla
	994**	DF
	1393**	Puebla
	1474**	DF
	1604**	Baja California
	1627**	DF
	1847**	Hidalgo
2012	1898**	Morelos
	2770**	DF
2011	3021**	Baja California
2012	3326**	Jalisco
	4901**	Tabasco
	5551**	Guanajuato
	5726**	Veracruz
	6023**	San Luis Potosí
	6301**	Sonora
	6607**	Querétaro

*GenBank, **Lab. GNMP



Fig. 30. Mapa de la distribución de las muestras 2009 - 2012. Se observa en color, los Estados de donde provienen las muestras.

Como se puede observar, las muestras provienen prácticamente del centro y norte del país.

En el análisis de secuencias se encontraron los cambios en los nucleótidos que generaron las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K (Fig. 31) y los resultados se observan en la tabla 8.

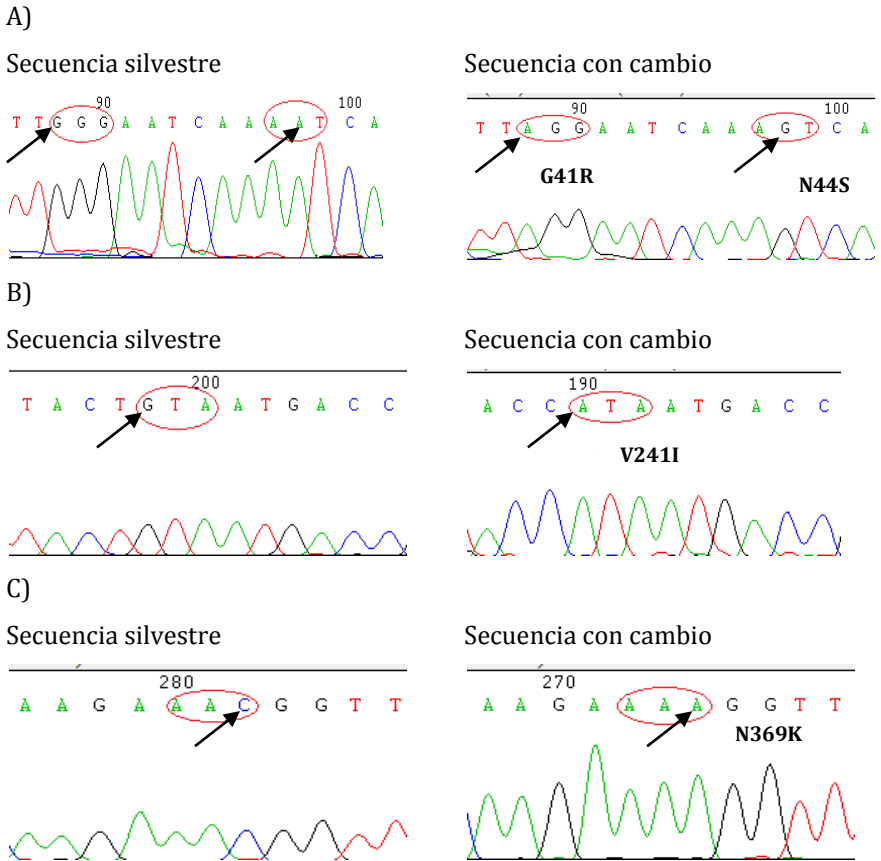


Fig. 31. Electroferogramas obtenidos, vistos en Chromas.

- A) Fragmento X: se muestra la mutación G41R: Gly → Arg y N44S: Asn → Ser.
- B) Fragmento Y: se muestra la mutación: V241I: Val → Ile y
- C) Fragmento Z: se muestra la mutación N369K: Asn → Lys.

Tabla 8. Análisis de 31 secuencias de cepas circulantes durante 2009-2011, para el rastreo de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K.

Año	Fragmento		X				Y/Z										
	Muestra	Mes	G41R	N44S	V62I	V67D	V241I	N248D	R257K	N309D	S339L	I365T	N369K	N386S	I389M	I393V	
2009	13555	Abr.						*									
	13551	Abr.						*									
	13495	Abr.															
	13547	Abr.															
	13494	Abr.															
	4487	Abr.															
	4114	Abr.															
	37381	Ago.							*								
	45229	Oct.							*								
	47089	Oct.					*	*									
	47656	Oct.						*									
50162	Nov.						*										
52057	Nov.						*										
2010	01	Ene.															
	182	Ene.															
	201	Ene.															
	705	Ene.															
	1779	Feb.					*	*									
2011	1155	Ene.		*			*	*				*					
	1945	Mar.						*									
	1946	Mar.						*									
	2194	Mar.						*	*			*	*	*			
	2202	Mar.				*		*	*			*	*	*			
	2419	Abr.			*			*	*			*	*	*	*	*	
	2425	Abr.						*	*			*	*	*			
	3740	Dic.	*	*			*	*					*				
	3760	Dic.	*	*				*					*				
	3752	Dic.					*	*		*	*		*				
	3753	Dic.	*	*			*	*					*				
3754	Dic.	*	*			*	*					*					
3766	Dic.	*	*			*	*					*					

*- Mutaciones esporádica

■ Muestras del brote de Chihuahua

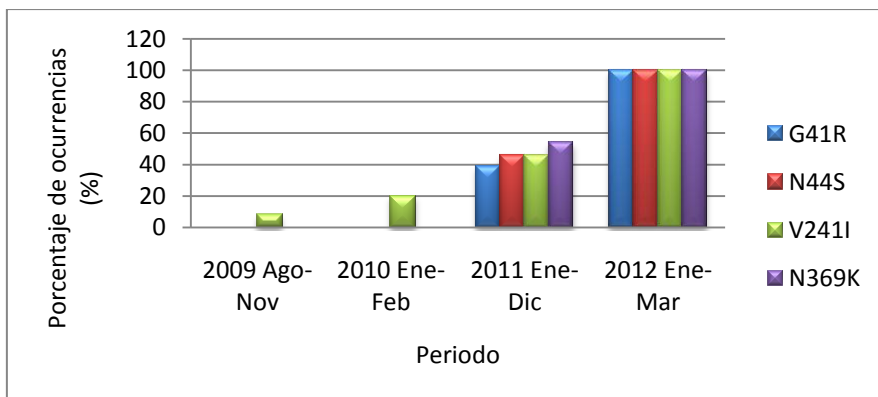
Las mutaciones V62I, V67D, R257K, I365T, N386S, N389M e I393V que se observan en algunas muestras son propias de un brote originado en Chihuahua en 2011 donde, de acuerdo a un estudio filogenético, circularon tres variedades denominadas A, B y C del virus (H1N1) pdm y por ello poseen características distintas al resto de las muestras.

Con estos datos se obtuvieron los porcentajes de la ocurrencia de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K de acuerdo al número de muestras de cada año (Tabla 9, Gráfica 1).

Tabla 9. Ocurrencia de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K en México.

Mutaciones	G41R (%)	N44S (%)	V241I (%)	N369K (%)
2009	-----	-----	8	-----
2010	-----	-----	20	-----
2011	39	46	46	54
2012	100	100	100	100

Gráfica 1. Origen en el tiempo de las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K.



En este análisis se encontró que las mutaciones G41R, N44S y N369K no estaban presentes en las secuencias de la NA de los virus circulantes durante el 2009 al 2010. Sin embargo según datos obtenidos del FluSurver hubo un reporte de la mutación G41R en la ciudad de México el 25 de enero del 2010 (Tabla 10), siendo México el país con mayor ocurrencias reportadas (Fig. 32). Además se encontró que una mutación equivalente a G41R en el subtipo N2 está relacionada con la resistencia al fármaco oseltamivir.



Fig. 32. Distribución geográfica de la mutación G41R.

Tabla 10. Ocurrencia mundial de la mutación G41R.

REGIÓN	NO. DE OCURRENCIAS	FECHA (AAAA MM DD)
México	5	2011 12 18
Singapur	2	2010 10 04
Boston	2	2012 02 21
Ciudad de México	1	2010 01 25
Corea	1	2009 09 25
Florida	1	2012 02 27

Un comportamiento similar al de la mutación G41R fue observado para las mutaciones N44S y N369K (Tabla 8, Gráfica 1), por lo que se sugiere que estas tres mutaciones pudieron haber surgido por deriva antigénica durante el 2010, para quedar asentadas en la temporada 2011 – 2012. Por otra parte, la mutación V241I se presentó en al menos una muestra analizada del 2009 por lo que se piensa que podría ser un cambio común en las cepas circulantes desde ese año.

En la base de datos FluSurver se han reportado 5 secuencias de virus circulantes en México que presentan las mutaciones N44S, V241I y N369K (Tabla 11).

Tabla 11. Ocurrencia mundial de las mutaciones N44S, V241I y N369K.

MUTACIÓN	REGIÓN	NO. DE OCURRENCIAS	FECHA (AAAA MM DD)
N44S	Singapur	68	2010 10 04
V241I	Singapur	92	2010 05 28
V241I y N369K	Niigata	7	2011 10 17
V241I y N369K	Nagasaki	5	2011 01 04
N44S, V241I y N369K	México	5	2011 12 18
	.	.	.

Con la estructura de la proteína NA de cepas relacionadas, que presentan una mutación en la posición equivalente a la de N369K, FluSurver reportó que está involucrada con los sitios de reconocimiento a anticuerpos, sin embargo no reporta efectos en la proteína con la mutación V241I. Por otra parte Hurt y cols. ⁽³⁸⁾ basados en un análisis computacional de la estabilidad de la NA, sugirieron recientemente la posibilidad de que las mutaciones V241I y N369K puedan restablecer la estabilidad que fue perdida como resultado de la aparición de la mutación H275Y en la proteína. Asimismo el análisis predijo que la mutación N369K en combinación con la mutación H275Y causa el cambio más grande en la estabilidad de la proteína, además de que aumenta su expresión y su actividad.

En FluSurver se explica también que la sustitución N44S crea un nuevo sitio potencial de N-Glicosilación en la posición 42 pues la organización de las posiciones 42-44 cambia de NQN (no glico) a NQS (glico) y esto puede tener efectos en la antigenicidad y otras propiedades de las cepas que adquieren esta mutación. Sin embargo Dapat y cols. ⁽³⁹⁾ reportaron que estos cambios aminoacídicos están localizados fuera de los sitios antigénicos,

aunado a esto Hurt y cols., señalan que esta región en la NA se encuentra en el tallo y no en la parte del dominio globular por lo que no se sabe cómo afectaría la estructura y la estabilidad de la proteína.

Actualmente se sabe que estas cuatro mutaciones en el virus pdm tienen importancia filogenética, pues estudios recientes para la vigilancia epidemiológica y control de la influenza demostraron que las cepas circulantes de la influenza (H1N1) pdm en el mundo durante la temporada 2011 - 2012 se pueden organizar en 8 grupos con base en estas mutaciones y en las mutaciones N248D y V106I (Fig. 33).

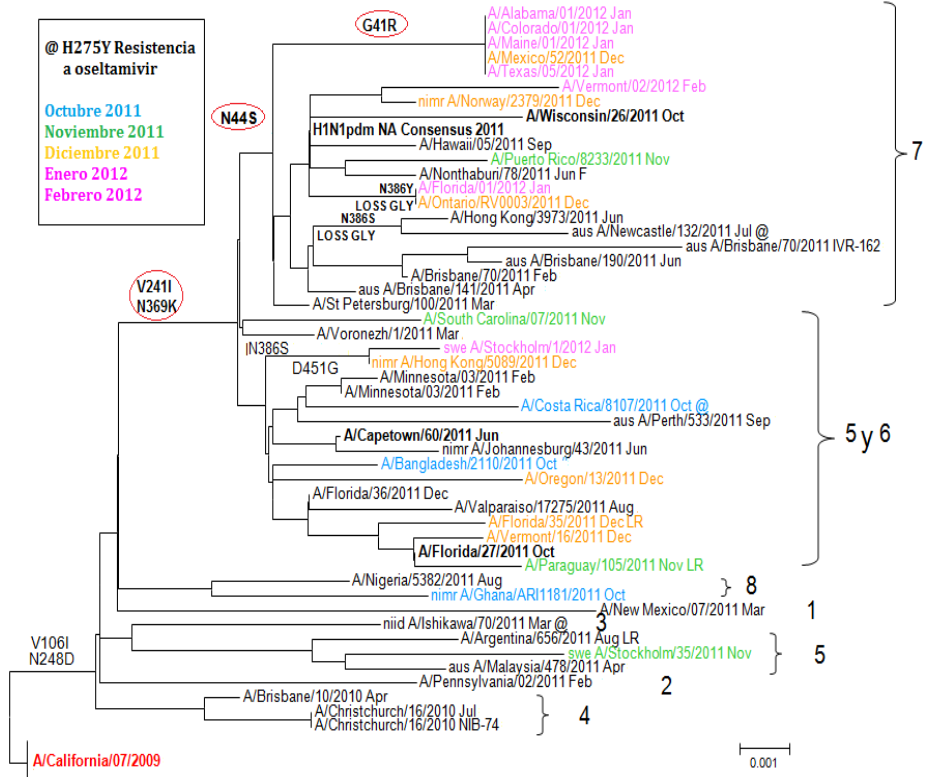


Fig. 33. Árbol filogenético de cepas del virus de la influenza A (H1N1) pdm circulantes durante 2011-2012 ⁽⁴⁰⁾.

De acuerdo a las mutaciones encontradas en las secuencias analizadas en este trabajo, la mayoría de las muestras de cepas circulantes en México en la temporada 2009-2010 se podrían ubicar en el grupo 4, ya que comparten únicamente la mutación N248D, mientras que las cepas circulantes en la temporada 2011-2012 se podrían concentrar en el grupo 7 debido a que comparten las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K, exceptuando aquellas que provienen del brote en Chihuahua. Sin embargo, lo anterior debe ser corroborado con la construcción de un árbol filogenético que incluya todas estas secuencias completas.

9. CONCLUSIONES.

- ✓ Se logró extraer el RNA íntegro del virus de la influenza A (H1N1) pdm de 15 muestras, el cual sirvió de molde para obtener la secuencia de los fragmentos de la NA analizados.
- ✓ Los análisis de las secuencias obtenidas permitieron determinar que las mutaciones G41R, N44S y N369K del gen de la NA no están presentes en la temporada 2009-2010 y que posiblemente surgieron por deriva antigénica a finales del 2010, para quedar asentados en la temporada 2011- 2012, mientras que la mutación V241I podría ser una característica común del virus pandémico desde su aparición en 2009.
- ✓ Las mutaciones G41R, N44S, V241I y N369K permiten organizar a las cepas mexicanas del periodo 2011 - 2012 en el grupo 7 de circulación mundial.

10. REFERENCIAS

1. Secretaria de Salud. Perfil epidemiológico de la pandemia de Influenza A (H1N1) 2009 en México. [monografía en internet]. México. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD. 2011. [acceso 14 de enero de 2013] Disponible en:
http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/pdfs/publicaciones/monografias/pepid_pandemia_influenza_AH1N12009.pdf
2. Influenza Humana A H1N1. [monografía en internet]. Observatorio para la salud; 2009. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en:
www.cucs.udg.mx/observatorio/files/File/Influenza_humana3.pdf
3. cdc.gov, Infección por el virus nuevo de la influenza A (H1N1) resistente al oseltamivir en dos pacientes inmunodeprimidos. [en línea]. Washington. CDC; 2009 [acceso 05 de noviembre de 2012]. Disponible en:
http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5832a3_ensp.htm
4. Ramírez, J.; González, E.; Alcántara, P.; Wong, C.; Olivera, H.; Cortez, I.; et al. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, México. E Infect Dis [en línea]. 2011; 17(2): 283-286. [acceso 14 de diciembre de 2012] Disponible en:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3204764/pdf/10-0897_finalD.pdf
5. Ortiz, J.; González, E.; Rodríguez A.; Garcés, F.; Segura, J.; Wong, C.; et al. Analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus circulating in Mexico during the 2011-2012 season by ultra-deep sequencing. F1000 Posters 2012, 3: 473 (poster). [acceso 14 de enero de 2013]. Disponible en: <http://f1000.com/posters/browse/summary/1090351>
6. Osoreo, F.; Gómez, J.; Suarez, L.; Cabezas, C.; Alave, J.; Maguiña, C. Un nuevo virus A/H1N1, una nueva pandemia: Influenza un riesgo permanente para una humanidad globalizada. Artículo de revisión. Acta Med Per. [en línea]. 2009; 26 (2): 97-130. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000200008

7. Mateos, S. Temas de bacteriología y virología médica: Virus respiratorios. [Monografía en internet]. Facultad de medicina; 2008. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Virusrespiratorios.pdf>
8. Soto, E. Influenza. ¿Por qué algunos mueren? Elementos. [en línea]. 2009; 75: 53-60. [acceso 05 de noviembre de 2012]. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num75/pdf/53.pdf>
9. Goyache, J.; Álvarez, J.; González, S.; García, N.; Pérez, M.; Martínez, I; et al. Virus de influenza A H1N1. [monografía en internet] Servicio de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria. 2009. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.colvema.org/pdf/611gripe.pdf>
10. Pedrari, S. Coordinadora. Nueva gripe A (H1N1) causada por el virus pandémico Influenza A (H1N1) 2009. [monografía en internet]. Buenos Aires: Comité de emergencias biológicas de la red de hospitales e institutos de la Universidad de Buenos Aires- Argentina. 2010 [acceso 04 de junio de 2012]. Disponible en: www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/gripe_a.pdf
11. Luchsinger, V. Características del virus influenza y diagnóstico de laboratorio. [Monografía en internet]. Universidad de Chile; 2009. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.neumologia-pediatrica.cl>
12. Aycachi, R. Inoculación de virus en huevos embrionados. [Monografía en internet]. [acceso 28 de noviembre de 2011]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/6851738/Virologia-Practica-05-Inoculacion-de-virus-en-huevos-embrionados>
13. Goñi Mazzitelli, N. Variabilidad genética y evolución molecular del virus de la influenza A en Uruguay. [Tesis Doctoral en línea]. Universidad de la república; 2011. [acceso 25 de abril de 2012]. Disponible en: www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/biol/uy24-15360.pdf
14. Etapas del proceso de infección. [monografía en internet]. 2007. [acceso 04 de junio de 2012]. Disponible en: www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Virologia/.../Leccion4_0708.pdf
15. Subbarao, K.; Joseph, T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. Nature Reviews. Immunology. [en línea].

- 2007; 7: 267-278. [acceso 03 de mayo de 2012]. Disponible en: www.nature.com/reviews/immunol2007
16. Oropesa, S. Orthomixovirus. En: Microbiología y parasitología médica. [capítulo en internet] 228-245. [acceso 25 de abril de 2012]. Disponible en: http://www.ungefcm.gq:8081/datas/agentesbiologicos/contenidos/generales/bibliografia_basica/microcap67.pdf 2000
 17. Manjarrez, M.; Arenas, G. Virus influenza: Enigma del pasado y del presente. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. [en línea]. 1999; 12(4): 290-299. [acceso 25 de abril de 2012]. Disponible en: www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-1999/in994h.pdf
 18. Flint, S.; Lynn, E.; Racaniello, V.; Skalka, A. Principles of Virology: Molecular Biology. [libro en internet]. Vol. 1. 3ª Ed. Estados Unidos: Molecular Biology; 2009. [Consulta el 04 de abril de 2012]. Disponible en: http://books.google.com.mx/books?id=55_CC4AAb2YC&pg=PA511&dq=structure+and+genomic+organization+of+the+orthomyxovirus+influenza+A&hl=es&sa=X&ei=-BrzT63-LaeJ8gGg_MDwDw&ved=0CDQQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false
 19. Valle, de la O.; Castillo, C.; Dade, A.; Gil, M. Infecciones respiratorias virales: influenza. Aspectos virológicos. Avances. 2010; 7 (20): 4-19.
 20. Michán, L. Análisis evolutivo de la Influenza A /H1N1. [en línea]. 2009. [acceso 04 de abril del 2012]. Disponible en: <http://literaturainfluenza.blogspot.mx/2009/05/los-ocho-segmentos-del-genoma-del-virus.html>
 21. López, S.; Arias, C. Influenza A: Biología, vacunas y origen del virus pandémico A/H1N1. Rev Dig Univ. [en línea]. 2010; 11 (4): 3-12. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.11/num04/art36/int36.htm>
 22. Secretaría de Fomento Social. Vacunas contra la influenza estacional y H1N1. En Curso: Diagnóstico oportuno, Manejo Clínico y Precauciones en el Tratamiento de la Influenza A (H1N1). [en línea]. 2009. [acceso 25 de abril de 2012]. Disponible en: www.chihuahua.gob.mx
 23. Becerra, A.; Castillo, A.; Hernández, C.; Jiménez, M.; Lazcano, A.; López, Y.; et al. Análisis evolutivo del virus de influenza A (H1N1): un reporte

- preliminar. [monografía en internet]. 2009. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en:
[www.oikos.unam.mx/influenza/ReporteEvolucionA\(H1N1\).pdf](http://www.oikos.unam.mx/influenza/ReporteEvolucionA(H1N1).pdf)
24. Knipe, D.; Howley P. *Fields Virología*. Vol. 1. 5ª Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
25. Patogenia. Aspectos epidemiológicos de la pandemia. [monografía en internet]. Buenos Aires. Comité de Emergencias Biológicas; 2009. [acceso 19 de abril de 2012]. Disponible en:
www.crid.or.cr/digitalizacion/pdf/spa/doc17721/doc17721-d.pdf
26. Prueba One Step® para la influenza A-H1N1(influenza porcina). [monografía en internet]. [acceso 01 febrero 2013]. Disponible en:
[http://www.diagnose.ws/otros-productos/prueba-rapida-a-h1n1.html#axzz2\]hZtzvVM](http://www.diagnose.ws/otros-productos/prueba-rapida-a-h1n1.html#axzz2]hZtzvVM)
27. Hayden, F. Antivirals for Influenza: Historical perspectives and lessons learned. Elsevier. *Antiviral Research*. [en línea]. 2006; 71: 372-378. [acceso 04 de agosto 2012]. Disponible en:
<http://download.thelancet.com/flatcontentassets/H1N1-flu/treatment/treatment-10.pdf>
28. Hayden, F. Antiviral Resistance in Influenza Viruses —Implications for Management and Pandemic Response. *N Engl J Med*. [en línea]. 2006; 354 (8): 785-788. [acceso 04 agosto 2012]. Disponible en:
http://www.col.ops-oms.org/prevencion/influenza/vacunacion/influenza_resistencia_antivirales.pdf
29. Moscona, A. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N Engl J Medi*. [en línea]. 2005; 353 (13): 1363-73. [acceso 04 de octubre de 2012]. Disponible en:
<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMra050740>
30. Necochea, R.; Canul, J. Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos. [monografía en internet]. Cuernavaca. Instituto de Biotecnología – UNAM; 2004. [acceso 07 de agosto de 2012]. Disponible en:
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf

31. Sánchez, M. Secuenciación automática de DNA. Estrategias de secuenciación. En curso: técnicas instrumentales. 2008. [acceso 01 de febrero 2013]. Disponible en:
imb.usal.es/formación/doctorado/cursos/técnica/secuenciación.pdf

32. Tekiel, V. Métodos de secuenciación del ADN. [monografía en internet]. 2008. [acceso 05 de noviembre de 2012]. Disponible en:
<http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=historia%20de%20secuenciación%20de%20genoma&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CCQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fgenoma.unsam.edu.ar%2Ftrac%2Fdocencia%2Fraw-attachment%2Fwiki%2FGeneticaHumana08%2FTrabajosPracticos%2FSecuenciación.pdf&ei=DhuYUKPLOcei2wWUmIGwAg&usg=AFQjCNHdljVVNkERfIIIMSVZG25hvejQ2Q>

33. Secuenciación de ADN. [monografía en internet]. 2010. [acceso 05 de noviembre de 2012]. Disponible en:
<http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm>

34. 3130 and 3130xl Genetic Analyzers. Getting Started Guide. [en línea]. USA. Applied Biosystem; 2010. [acceso 24 de octubre del 2012]. Disponible en:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041468.pdf

35. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. 3° Ed. [en línea]. QIAGEN; 2010. [acceso 14 de noviembre de 2012]. Disponible en:
<http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&ved=0CDoQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fliterature%2Frender.aspx%3Fid%3D200375&ei=mMXHUOXUE6We2gWkvoH4Dw&usg=AFQjCNGM1zwtSCES5hPaeIPUGYaq-Xf-4Q>

36. Deyde, V.; Sheu, T.; Trujillo, A.; Okomo, M.; Garten, M.; Klimov, A.; et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pirosequencing. American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010; 54 (3): 1102-1110.

37. De la Rosa-Zamboni D, Vázquez, J.; Ávila, S.; Carranco, A.; Ormsby, C.; Cummings, C.; et al. Molecular Characterization of the Predominant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Mexico, December 2011–February

2012. 2012. PLoS ONE 7(11): e50116.
doi:10.1371/journal.pone.0050116

38. Hurt, A.; Hardie, K.; Wilson, N.; Deng, Y.; Osbourn, M.; Leang, S.; et al. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir resistant A (H1N1) pdm 09 influenza in Australia. *J Infect Dis.* 2012. [Acceso 20 de febrero de 2013]. Disponible en: <http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2012/05/04/infdis.jis337.full.pdf>
39. Dapat, I.; Dapat, C.; Baranovich, T.; Suzuki, Y.; Kondo, H.; Shobugawa, Y.; et al. Genetic Characterization of Human Influenza Viruses in the Pandemic (2009–2010) and Post-Pandemic (2010–2011) Periods in Japan. 2012; 7(6): e36455. doi:10.1371/journal.pone.0036455. [acceso 20 de febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036455>
40. Cox, N. Information for the vaccine and related biological advisory committee CBER, FDA. (Seasonal Influenza and Zoonotic Influenza) [En línea] CDC. 2012. [acceso 15 de febrero del 2013]. Disponible en: https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fdownloads%2FAdvisoryCommittees%2FCommitteesMeetingMaterials%2FBloodVaccinesandOtherBiologics%2FVaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee%2FUcm300419.pptx&ei=hEMIUcidEObL2QX_x4H4CA&usg=AFQjCNEp3PFbUkq_1V7nxRleevhPqjdF2g&bvm=bv.42661473,d.b2U