



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**FILOGENÉTICA MOLECULAR DEL VIRUS DE  
INFLUENZA PORCINA EN MÉXICO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ROLANDO BELTRAN FIGUEROA**

**TUTOR: MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**COMITÉ TUTOR: SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN**  
Instituto de Biotecnología  
**FRANCISCO JOSE TRIGO TAVERA**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**MÉXICO D.F. MAYO 2014**

## ÍNDICE

RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
Estructura Viral .....	1
La hemaglutinina .....	3
La neuraminidasa .....	5
Transmisión Interespecies .....	6
Evolución viral .....	9
El papel del cerdo en la transmisión del virus de influenza .....	13
Análisis bioinformático y Filogenética Molecular .....	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVOS .....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
Obtención de muestras .....	19
Extracción de RNA genómico viral .....	19
Transcriptasa Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	19
RT-PCR Multisegmento.....	20
Secuenciación.....	20
Edición de las secuencias.....	21
Análisis Filogenético .....	21
RESULTADOS.....	23
Subtipificación mediante One Step RT-PCR .....	23
Identificación del Virus de Influenza mediante RT-PCR Multisegmento .....	23
Similitud BLASTn secuencias en nucleótidos.....	24
Similitud BLASTp en secuencias en aminoácidos .....	24
Secuenciación genómica en los virus referencia .....	25
Secuenciación genómica en muestras clínicas .....	26

Árboles Filogenéticos en Nucleótidos .....	26
Árboles Filogenéticos basado en aminoácidos .....	27
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS .....	37
LISTA DE CUADROS.....	48
Cuadro 1. Nomenclatura y tipo de muestras clínicas, resultados mediante diferentes técnicas moleculares. ....	48
Cuadro 2. Secuencias pandémicas periodo 2009-2012 identificadas en cerdos y humanos en México, incluidas en el analisis bioinformatico. ....	49
Cuadro 3. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011 en nucleótidos, tamaño de la secuencia obtenida de 701 pb. ....	50
Cuadro 4. Análisis BLAST secuencias N1 en nucleótidos de muestras clínicas: A/Cerdo/Veracruz/0/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/1/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/2/09/N1, A/Cerdo/Oaxaca/20/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/49/09/N1, A/Cerdo/Veracruz/31/09/N1	51
Cuadro 5. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011/H3 secuencias en nucleótidos, tamaño de la secuencia obtenida de 666 pb. ....	52
Cuadro 6. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011/N2 secuencias en nucleótidos, tamaño de la secuencia obtenida de 382 pb. ....	53
Cuadro 7. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011/N1 secuencias en aminoácidos 178 residuos. ....	54
Cuadro 8. Análisis BLAST secuencias en aminoácidos muestras clínicas: A/Cerdo/Veracruz/0/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/1/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/2/09/N1, A/Cerdo/Oaxaca/20/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/49/09/N1, A/Cerdo/Veracruz/31/09/N1	55
Cuadro 9. Análisis BLAST del virus A/cerdo/DMZC/2011/H3 secuencias en aminoácidos 220 residuos. ....	56
Cuadro 10. Análisis BLAST del virus A/cerdo/DMZC/2011/N2 secuencias en aminoácidos 119 residuos. ....	57
Cuadro 11. SNPs identificados en el segmento N1 secuencias en nucleótidos.....	58
Cuadro 12. Cambios evolutivos identificados en el segmento N1 secuencias en aminoácidos. ....	59
Cuadro 13. SNPs identificados en el segmento H3 secuencias en nucleótidos.....	60
Cuadro 14. Cambios evolutivos identificados en el segmento H3 secuencias en aminoácidos. ....	60
Cuadro 15. Cambios evolutivos identificados en el segmento N2 secuencias en aminoácidos. ....	61

LISTA DE FIGURAS .....	62
Figura 1.    a) Estructura viral del virus de influenza. ....	62
b) Filogenética de la hemaglutinina. ....	62
Figura 2. Tinción de lectina para la identificación de receptores de ácido sialico en intestino de pato (colón) $\alpha 2,3Gal$ y receptores en tráquea de cerdo $\alpha 2,3Gal$ y $\alpha 2,6Gal$ . .....	62
Figura 3. Afinidad de receptores virales en diferentes huéspedes. Los virus aviares se unen preferentemente a $\alpha 2,3Gal$ , que se encuentra en el intestino y el tracto respiratorio de las aves. Los virus humanos estacionales H1N1, H3N2 y H1N1 pandémico 2009 tienen una mayor afinidad por $\alpha 2,6Gal$ , que se expresan en el tracto respiratorio superior de los seres humanos. ....	63
Figura 4. Transmisión interespecies, las aves acuáticas silvestres son reservorios naturales de los 16 subtipos identificados de la hemaglutinina. Las líneas continuas indican transmisión de eventos frecuentes o confirmados, las líneas de puntos, posibles eventos ocasionales de transmisión. ....	64
Figura 5. Estructura 3D del complejo de la neuraminidasa del virus H1N1/2009 y posición de la Mutación His274Tyr que indica la resistencia al antiviral Oseltamivir (Tamiflu). ....	64
Figura 6. Alineación de secuencias del segmento H3 posición Gln226 (Q=Glutamina) y Thr 228 (T=Treonina). ....	65
Figura 7. Alineación de secuencias del segmento N1 posición His274Tyr. ....	65
Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del segmento N1 a partir de muestras clínicas y virus referencia, se presentan secuencias en nucleótidos con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. ....	66
Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento H3 a partir de secuencias en nucleótidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. ....	67
Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento N2 a partir de secuencias en nucleótidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. ....	68
Figura 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del segmento N1 a partir de muestras clínicas y virus referencia, se presentan secuencias en aminoácidos con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. ....	69
Figura 12. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento H3 a partir de secuencias en aminoácidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. ....	70
Figura 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento N2 a partir de secuencias en aminoácidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. ....	71

# FILOGENÉTICA MOLECULAR DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA EN MÉXICO

## RESUMEN

La influenza porcina es una enfermedad respiratoria en cerdos, que tomó suma relevancia desde la pandemia humana del 2009, debido a la asociación con el cerdo ya que representaba un problema en salud pública, lo que ocasionó pérdidas económicas por la baja en el consumo de la carne de cerdo. Por tal motivo es importante el diagnóstico en humanos y porcinos, para determinar los subtipos presentes en ambas especies y determinar la similitud de los virus circulantes, así como su constante evolución. El objetivo del presente trabajo fue identificar y determinar la variabilidad genética de las glicoproteínas de superficie del virus de influenza en cerdos mediante la aplicación de análisis bioinformáticos. Se analizaron un total 33 muestras obtenidas durante el periodo 2009-2011, para identificar el subtipo se realizó una One Step RT-PCR multiplex en donde se determinó que 14 muestras fueron positivas al segmento N1, 3 al segmento N3 y 1 muestra positiva al segmento H3 mientras que el segmento H1 no fue identificado, además, se determinó la presencia del virus en muestras de semen, así como la identificación de dos subtipos diferentes en una muestra (co-infección). Mediante la RT-PCR multisegmento, 9 muestras fueron positivas. Los resultados obtenidos mediante la secuenciación genómica de los virus de referencia presentan cambios en sus secuencias nucleotídicas y en aminoácidos, la muestra A/Cerdo/DMZC/11/H3 presentó un cambio importante en la posición 226 de aminoácidos a glutamina; y en la posición 228 a treonina, lo que sugiere la afinidad a receptores aviares. De los ocho electroferogramas obtenidos a partir de las muestras clínicas, se observó un cambio de histidina por tirosina en la posición 274, lo que implica la resistencia al antiviral oseltamivir. El análisis filogenético determinó que no existe una similitud entre los virus que circulan en cerdos y los virus humanos pandémicos, sin embargo, presentan una similitud a virus de influenza que circularon con anterioridad en cerdos de Norteamérica, además de su estrecha relación con otros huéspedes como las aves.

**Palabras clave:** influenza porcina, filogenética, bioinformática, diagnóstico molecular.

## MOLECULAR PHYLOGENETIC OF SWINE INFLUENZA VIRUS IN MEXICO

### ABSTRACT

Swine flu is a respiratory disease in pigs, which has taken utmost importance from the human pandemic of 2009, due to the association with the pig since it represented a problem in public health, which also caused an economic loss by the decline in the consumption of pork. For this reason, it is important the diagnosis in humans and pigs to determine the subtypes present in both species and determining the similarity of the circulating viruses as well as its constant evolution. The aim of the present study was to identify and determine the genetic variability of the surface glycoprotein's of the influenza virus in pigs through the application of bioinformatics analysis. A total of 33 samples obtained during the period 2009-2011 were analyzed; to identify the subtype, a One Step RT-PCR multiplex was carried out after which it was determined that 14 samples were positive to the N1 segment, 3 were positive to the segment N3 and 1 was positive to the H3 segment while the H1 segment was not identified, also it was determined the presence of the virus in semen samples, as well as the identification of two different subtypes in a sample (co-infection). By the RT-PCR multi-segment, 9 samples were positive. The results obtained by Genomic sequencing of reference viruses have changes in their nucleotide sequences and amino acids, sample A/swine/DMZC/11/H3 presented a major shift in position 226 of amino acids to glutamine; and in position 228 to threonine, suggesting affinity to avian receptors. Of the eight electropherograms obtained from clinical specimens a change of histidine by tyrosine was observed at position 274, implying resistance to the antiviral oseltamivir. The phylogenetic analysis determined that there is not similarity between the viruses that circulate in pigs and the human pandemic viruses, however, in this study the swine flu viruses analyzed showed a similarity to flu viruses that circulated earlier in pigs in North America, as well as its close relationship with other guests such as birds.

**Keywords:** swine influenza, phylogenetic, bioinformatics, molecular diagnosis.

## INTRODUCCIÓN

### Estructura Viral

Los virus de influenza son virus RNA de cadena sencilla polaridad negativa, se clasifican dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, tienen una apariencia pleomórfica, con partículas esféricas de un diámetro promedio de 100 nm y partículas elongadas de 300 nm de extensión (Cox *et al.*, 2000).

El genoma del virus de la influenza está constituido por ocho segmentos de RNA de polaridad negativa, que codifican para once proteínas virales, con tamaños que van desde 2350 nucleótidos hasta 890 nucleótidos, en total el genoma tiene aproximadamente 13600 nucleótidos (Bouvier y Palese 2008) (Palese y Shaw 2006).

Cada uno de los segmentos presentan una región que codifica para una o dos proteínas, así como secuencias cortas que las flanquean. Los segmentos 2, 7 y 8 codifican para dos proteínas y el resto para una proteína. Tres segmentos codifican para el complejo de la polimerasa: la polimerasa básica 2 (PB2) en el segmento 1; la polimerasa básica (PB1) en el segmento 2; y la proteína ácida (PA) en el segmento 3. El segmento 2 codifica también para la proteína apoptótica F2 con otro marco de lectura distinto a PB1. Dos segmentos codifican para glicoproteínas antigénicas de la envoltura, que son la hemaglutinina (HA) en el segmento 4 y la neuraminidasa (NA) en el segmento 6. El segmento 5, codifica la nucleoproteína (NP). El segmento 7 codifica para las proteínas estructurales de la matriz, M1 y M2 que tienen una corta sobreposición dentro de este segmento. Finalmente el segmento 8, que es el más pequeño del genoma, codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2, que intervienen como antagonistas de la transcripción de genes regulados por el interferón- $\beta$ , y en la exportación hacia afuera del núcleo, de las ribonucleoproteínas virales (Steinhauer y Skehel 2002) (Lamb y Klug 2006) Ver Figura 1 (a).

La partícula viral tiene una envoltura lipídica en la que se encuentran insertadas tres de las proteínas virales: las glicoproteínas HA y NA y la proteína transmembranal M2, con una relación aproximada de 40:20:1. Las tres proteínas rodean a una capa de proteína matriz M1, la cual tiene en su interior el genoma viral. El genoma del virus está a su vez recubierto por la nucleoproteína NP y está asociado a un complejo proteínico formado por las tres proteínas que componen la RNA polimerasa viral, constituido por dos subunidades básicas (PB1, PB2) y una subunidad ácida (PA). En el interior de la partícula viral se encuentra además, la proteína de exportación nuclear NEP, también conocida como proteína no estructural 2 (NS2) (Bouvier y Palese 2008) (Palese y Shaw 2006).

Todos los genes virales tienen en sus extremos regiones 5' y 3' no traducidas de longitudes variables que contienen las señales de unión para la RNA polimerasa del virus, así como las señales necesarias para la encapsidación del genoma viral. Los últimos 13 y 12 nucleótidos de los extremos 5' y 3', respectivamente están altamente conservados entre todos los genes del virus (Palese y Shaw 2006).

Los virus de influenza se clasifican en tres tipos A, B y C, estudios filogenéticos indican que los tres tipos de influenza tienen un ancestro común, sin embargo han divergido a tal grado que los rearrreglos genéticos sólo puedan ocurrir entre virus del mismo tipo. (Strauss y Strauss E, 2008) (Wright *et al.*, 2006) Se distinguen taxonómicamente por diferencias antigénicas, principalmente en la nucleoproteína (NP) y en la proteína matriz (M) (Cox *et al.*, 2000).

La influenza tipo A se ha aislado en muchas especies animales que incluyen al cerdo, caballo, mamíferos marinos, aves domésticas y silvestres, y también al humano (Webster *et al.*, 1992).

Para el tipo A, la identificación de subtipos se basa en la antigenicidad de dos glicoproteínas de superficie de los viriones, la hemaglutinina y la neuraminidasa. Hasta el momento se han identificado 16 HA y 9 NA. Es importante señalar que todas las probables combinaciones de estas glicoproteínas se han identificado en aves silvestres (Webster *et al.*, 1992).

Debido a la naturaleza segmentada del virus de influenza A, existe la posibilidad de que ocurran reordenamientos cuando diferentes subtipos virales infectan a un



mismo individuo. Los rearrreglos ocurren por la co-infección de dos o más virus diferentes. El resultado es una progenie de viriones que pueden contener una combinación aleatoria de segmentos de los virus parentales (Rabadan y Robins 2007).

Los tipos B y C son predominantemente patógenos de humano (Cox *et al.*, 2000). Aunque esporádicamente se han encontrados en porcinos (Guo *et al.*, 1983) y focas (Osterhaus *et al.*, 2000).

Los virus de influenza tipo B realizan antigenic drifts y no poseen la capacidad de producir antigenic shifts, debido a que su genoma no es segmentado (Hoffmann *et al.*, 2005).

Las proteínas HA y NA pueden variar entre un 20% y un 50% de la proteína original de los subtipos previamente circulantes en humanos y así los nuevos virus evitan ser reconocidos por el sistema inmune. Es importante que estos rearrreglos pueden suceder entre virus de influenza provenientes de diferentes especies animales (Doherty *et al.*, 2006).

## **La hemaglutinina**

Es una de las glicoproteínas mayoritarias de la partícula viral y representa el principal antígeno de neutralización del virus, esta proteína, como su nombre lo indica, tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos. La membrana de los eritrocitos es rica en una sialoglicoproteína llamada glicoforina, la cual tiene un alto contenido de ácidos siálicos que son reconocidos por la hemaglutinina dando lugar a la formación de redes de eritrocitos o hemaglutinación, propiedad que ha sido utilizada para la clasificación de los diferentes subtipos de virus de influenza A (Neumann *et al.*, 2009) (Wright *et al.*, 2006).

La hemaglutinina también juega un papel determinante en la entrada del virus a la célula huésped. Esta proteína se sintetiza como una proteína precursora llamada H0, la cual es proteolíticamente cortada en HA1 y HA2 en una región específica que contiene un aminoácido básico (lisina o arginina), lo que resulta en la

activación de la infectividad del virus. Este corte proteolítico expone un péptido hidrofóbico en el amino terminal de HA2 que es responsable de mediar la fusión de membranas viral y celular durante la endocitosis, lo que permite el paso de la ribonucleoproteína del virus al citoplasma de la célula. Se ha observado que a diferencia de los subtipos de baja patogenicidad, los subtipos de alta patogenicidad tienen no sólo uno, sino varios aminoácidos básicos en el sitio de corte, lo que hace particularmente susceptibles a ser activadas proteolíticamente y por lo tanto a ser más infecciosas (Kawaoka y Webster 1988).

La hemaglutinina media la unión del virus con su célula huésped, ya que es la proteína responsable del reconocimiento del ácido siálico en enlaces  $\alpha$ -2-3 o  $\alpha$ -2-6 galactosa (Ito *et al.*, 1998) (Rogers y Paulson 1983).

Existen diferencias entre el tipo de receptores de HA y la localización anatómica en distintos hospederos. El virus reconoce a la célula hospedera mediante receptores que contienen ácido N-acetilsialico ligado a la galactosa. Lo que hace la diferencia en el reconocimiento de los distintos hospederos, es el tipo de enlace que une al ácido siálico con la galactosa. Mientras que los virus que se han adaptado al humano, reconocen preferentemente receptores con enlace  $\alpha$ 2,6Gal, los receptores de aves reconocen al virus cuando el enlace es  $\alpha$ 2,3Gal (Rogers y D Souza 1989) (Connor *et al.*, 1994) (Couciero *et al.*, 1993) (Ito y Kawaoka 2000) (Skehel y Wiley 2000).

Análisis filogenéticos han identificado dos grupos y cuatro principales clados H1, H9, H3, H7 y seis clusters de donde derivan los diferentes 16 subtipos de hemaglutininas (Medina y Garcia Sastre 2011) Ver *Figura 1 (b)*.

Los diferentes aminoácidos de esta proteína son responsables del reconocimiento de los diferentes tipos de enlaces de ácido siálico, se conoce que residuos de glutamina en la posición 226 y glicina en la posición 228 de las hemaglutininas H2 y H3, permiten la unión de estas proteínas a receptores de tipo aviar; mientras que si se identifican residuos de leucina y serina en estas mismas posiciones, el virus se une a receptores humanos. Para las hemaglutininas tipo H1, residuos de ácido glutámico y glicina en las posiciones 190 y 225 respectivamente, confieren especificidad de unión a receptores aviares, mientras que la presencia de ácido

aspártico en estas posiciones, sugiere especificidad de unión a receptores humanos (Stevens *et al.*, 2004).

## **La neuraminidasa**

La segunda proteína externa del virus de influenza, la cual constituye del 20% al 25% de las proteínas de superficie, es la neuraminidasa (Gallaher 2009).

La neuraminidasa es una glicoproteína que tiene actividad de sialidasa, cuya función es la de remover los ácidos siálicos de las glicoproteínas HA y NA de los virus recién sintetizados, así como los presentes en la superficie celular, lo que permite la eficiente liberación del virus. Esta actividad también es necesaria para remover los ácidos siálicos de la capa de mucina que recubre a las células epiteliales, lo que permite al virus llegar eficientemente a sus células blanco. Cuando se inhibe la actividad de esta proteína, se provoca que los virus producidos en una célula, se mantengan unidos a la célula infectada y agregados entre sí, lo que inhibe su diseminación a otras partes (Palese y Shaw 2006) (Wright *et al.*, 2006).

Las neuraminidasas son normalmente utilizadas como determinantes antigénicas encontradas en la superficie del virus de la influenza (Kilbourne *et al.*, 1995).

Algunas de las variantes de la neuraminidasa confieren mayor virulencia al virus que otras. De ahí que esta glicoproteína sea uno de los componentes de las vacunas contra la influenza (Tanimoto *et al.*, 2005).

Existe evidencia que los anticuerpos contra la neuraminidasa, si bien no previenen la infección, podrían disminuir la severidad de la misma (Gillim y Subbarao 2007).

Además es el blanco de los antivirales oseltamivir y zanamivir utilizados principalmente en el tratamiento contra la influenza de humanos. Estas moléculas son inhibidores específicos de la actividad de sialidasa de la proteína. La mutación más frecuente que confiere la resistencia de la neuraminidasa subtipo N1 a este fármaco, es la sustitución de un residuo de histidina en la posición 274 por un residuo de tirosina (Dharan *et al.*, 2009).

## Transmisión Interespecies

La infección inicia cuando el virus se une al ácido N-acetilneuramínico (siálico) presente en la superficie de las células. El ácido siálico es un monosacárido de nueve carbonos que se encuentra frecuentemente en el extremo de la cadena de oligosacáridos de muchos glicoconjugados. Es una molécula abundante en todas las células y define el tropismo de los virus de influenza, debido a la especificidad que tienen diferentes cepas del virus por distintos tipos de enlaces del ácido siálico con el azúcar que les precede en la cadena de carbohidratos, el cual usualmente es una galactosa.

El ácido siálico es reconocido por la hemaglutinina de los virus de influenza. Los virus de influenza aislados en humanos se unen principalmente a ácidos siálicos en unión  $\alpha$ -2-6, mientras que los virus aviares se unen preferentemente a ácidos siálicos con unión  $\alpha$ -2-3. Los cerdos presentan ambos receptores por lo que se les ha relacionado como amplificadores de virus humanos y aviares, sin embargo recientemente se ha identificado que el humano presenta también ambos receptores en el epitelio respiratorio aunque el enlace  $\alpha$ -2-3 en menor cantidad (Palese y Shaw 2006) (Strauss y Strauss 2008).

La afinidad por el tipo de enlace de ácido siálico determina la restricción de huésped de los virus de influenza. La expresión diferencial de estos receptores en el tracto respiratorio de los humanos explica la baja infectividad pero alta patogenicidad de algunas cepas de origen aviar, ya que estas glicoproteínas con ácidos siálicos en unión  $\alpha$ -2-3 se expresan particularmente en el tracto respiratorio bajo (bronquiolos y alvéolos), con lo cual están menos accesibles al virus, pero más susceptibles a una infección grave cuando ésta se produce (De Jong *et al.*, 2006) (Tran *et al.*, 2004) Ver *Figura 2*.

En el cerdo se encuentran presentes en el tracto respiratorio ambos tipos de receptores, es decir, aviares ( $\alpha$ 2,3Gal) y humanos ( $\alpha$ 2,6Gal) (Ito *et al.*, 1998) hecho que explica porque este hospedero es altamente susceptible de ser infectado tanto por virus humanos como aviares. Por esta razón se le atribuye al cerdo el papel de ser un amplificador de virus de influenza donde se genera los

reordenamientos de segmentos de virus aviáres y humanos tras eventos de coinfección que dan como resultado zoonosis (Scholtissek *et al.*, 1985).

Aunque se reconoce al cerdo como el intermediario entre virus de influenza aviar y humana, se han encontrado receptores de tipo aviar en los pulmones de algunas personas, lo que permitiría una transmisión directa de ave a humano (zoonosis aviar), sin que ocurra una adaptación previa en el cerdo, tal y como ocurrió en el brote epidémico humano del virus de origen aviar A (H5N1) (Shinya *et al.*, 2006) (Gambotto *et al.*, 2008). Ver Figura 3.

La gran afinidad de adhesión del virus a estos receptores está determinada por la secuencia de aminoácidos de HA. En los subtipos H2 y H3, una glutamina en las posiciones 226 (Gln226) y una glicina en la posición 228 Gly (Gly228) confieren la adhesión a receptores de tipo aviar, mientras que la leucina en la posición 226 (Leu226) y serina en la posición 228 (Ser228), son reconocidos por receptores humanos (Connor *et al.*, 1994) (Stevens *et al.*, 2004).

En el subtipo H1, un ácido aspártico en las posiciones 190 (Asp190) y 225 (Asp225) ha sido encontrado en humano, mientras que un ácido glutámico en la posición 190 (Glu 190) y glicina en la posición 225 (Gly225) en el tipo aviar (Stevens *et al.*, 2004).

En el subtipo H3 el Asp190 se encuentra tanto en humano como en cerdo, y el Glu encontrado en virus aviáres en esa misma posición, no es responsable de su afinidad (Matrosovich M, 2000). Cambios experimentales de aminoácidos Gln226Leu y Gly228Ser pero manteniendo sin cambio en la posición 190, permite el reconocimiento tanto en receptores aviáres como humanos (Stevens *et al.*, 2006).

Webster propone la transmisión del virus de influenza A entre diferentes hospederos partiendo de un origen aviar (Webster *et al.*, 1992). Por lo tanto el análisis filogenético de los virus de influenza A permite postular que los virus que infectan a mamíferos surgieron a partir de cepas de virus de origen aviar, ya que la tasa de evolución es mucho menor para virus que circulan en aves silvestres en comparación con aquellos que circulan en mamíferos (Palese y Shaw 2006) (Wright *et al.*, 2006).

En las aves circulan todos los subtipos de HA y NA descritos hasta ahora, y se piensa que son la fuente de los virus que son transmitidos a los demás animales, incluyendo a las aves de corral. Los subtipos H5 y H7 denominados de alta patogenicidad causan enfermedad severa y muerte entre algunas especies de aves silvestres, así como en aves domésticas, tales como pollos y pavos. Algunas cepas de influenza infectan a los cerdos de manera asintomática, mientras que otras pueden causar en estos animales síntomas similares a los que se presentan en humanos (Wright *et al.*, 2006) Figura 4.

Recientemente Gatherer *et al.*, 2009 realizaron una revisión de todas las especies para las que existen secuencias nucleotídicas de la HA documentadas en la base de datos del National Center Biothechnology Information (NCBI) y encontraron que además de las aves, al menos 18 especies de mamíferos incluyendo al humano, son infectados por el virus de influenza A.

De 16 subtipos de HA seis fueron identificados en humanos H1, H2, H3, H5, H7 y H9. A excepción de H7 los cinco subtipos restantes también fueron aislados en cerdo. El subtipo H4 es el único presente en cerdo que no se ha aislado en humano. Después de H5, que es el subtipo aislado en el mayor número de especies, el subtipo H1, ocupa el segundo lugar en cuanto a número de especies infectadas (Gatherer 2009).

El diagnóstico en cerdos frecuentemente se realiza para la identificación de los subtipos estacionales H1N1 H3N2 y H1N2 sin embargo se han identificado diferentes subtipos virales en otras regiones del mundo como por ejemplo: H1N7 en Inglaterra (Brown 1994 e Ito *et al.*, 1998) H2N3 en Estados Unidos (Ma *et al.*, 2007) H3N1 en Italia y Estados Unidos (Moreno 2009) (Ma *et al.*, 2007) H3N3 en Canadá (Karasin 2004); H3N8 en China (Tu 2009) H4N6 en Canadá (Karasin 2000) H9N2 en China (Yu 2008).

## Evolución viral

Una de las características naturales de los virus RNA, es la de mutar, es decir realizar cambios en su secuencia genética. Esto ocurre con mayor frecuencia en virus con material genético formado por RNA (Butler 2009) (Treanor 2004) ya que las RNA polimerasas responsables de la replicación viral, a diferencia de las DNA polimerasas, carecen de capacidad editora, es decir si la RNA polimerasa al momento de hacer una copia de la cadena de RNA introduce una base por otra, no tiene la capacidad de corregir el error, resultando en una cadena mutada. Con el paso del tiempo estas mutaciones se acumulan, provocando que dentro de un individuo infectado pueden existir variantes del mismo virus. Este fenómeno ha permitido que existan variantes del mismo virus, sin embargo, es importante destacar que estos cambios no son suficientes para dar lugar a un nuevo virus (Treanor 2004).

Los virus de influenza sufren constantes variaciones antigénicas en sus proteínas HA y NA para escapar a la respuesta inmune del huésped, mediante dos mecanismos los cuales se les conoce como deriva antigénica (antigenic drift) y cambio antigénico (antigenic shift) (Drake 1993).

La deriva antigénica resulta de mutaciones puntuales que ocurren en los genes como resultado de los frecuentes errores de copiado de RNA polimerasa viral. La infidelidad de la replicación del RNA viral resulta de una tasa de mutación de  $7.3 \times 10^{-5}$  mutaciones/nucleótido replicado (Drake 1993).

Este cambio continuo que genera modificaciones en la estructura de las proteínas del virus, ocasiona variaciones en los sitios antigénicos. Cabe señalar que las proteínas externas o de superficie de este virus son las que están sujetas a mayor presión selectiva. El dominio HA1 de la proteína HA es el que presenta el mayor número de epítopes lo cual indica que es la proteína más expuesta a esta presión de selección. Esta es la causa principal de la necesidad de renovar la vacuna contra la influenza estacional frecuentemente con un conjunto de virus humanos distintos (Fitch *et al.*, 1991) (Suzuki *et al.*, 2006).

El *antigenic drift* genera cambios en la secuencia de aminoácidos que dificultan el reconocimiento de estas proteínas por parte de los anticuerpos, lo que permite que una proporción de la población viral escape a la respuesta inmune adaptativa (Doherty *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que una sola mutación puntual en la proteína de superficie HA y en el complejo de la RNA polimerasa, son suficientes para que el virus pueda ser transferido de una especie a otra (Butt *et al.*, 2005) (Fouchier *et al.*, 2004).

Algunos cambios puntuales en la secuencia de las proteínas del virus de influenza A, fueron identificados como determinantes de especificidad, y son claves para el reconocimiento exitoso por el hospedero. En la HA y PB2 han sido identificados estos cambios (Neumann *et al.*, 2009) (Horimoto y Kawaoka 2005).

Por otra parte el cambio antigénico se debe a la naturaleza segmentada del genoma del virus. Esta particular característica facilita que cuando dos subtipos diferentes de virus infectan a un mismo huésped, los genes puedan mezclarse y produzcan una constelación de nuevos virus que portan diversas combinaciones de genes de los virus parentales. Se piensa que este tipo de intercambio de genes entre virus de diferentes especies animales ocurre principalmente en los cerdos. Debido a que los cerdos se infectan con virus de origen aviar, humano, y por supuesto porcino (Strauss y Strauss 2008).

El *antigenic shift* es la capacidad del genoma del virus de la influenza de reorganizarse e intercambiar las regiones codificantes para las proteínas virales de diferentes subtipos de virus de influenza, resultando en la generación de variantes de virus conocidos como virus reorganizantes. Estos reorganizos son favorecidos por la estructura segmentada del genoma viral (Doherty *et al.*, 2006).

Cuando el segmento de RNA que es reemplazado proviene de un linaje distinto, entonces se dice que ocurrió un reordenamiento o arreglo nuevo. Las combinaciones resultantes repercuten en la ampliación del rango de hospedero y en la patogenicidad del virus. Esto es debido a que las poblaciones de hospederos potenciales, no poseen memoria inmunológica ante este nuevo virus, lo que se conoce como “cambio antigénico” (Webster *et al.*, 1992).



Las cepas de influenza A que circulan en humanos presentan una tasa de evolución que difiere en cada segmento del genoma. Por ejemplo los virus subtipo H1N1 en las proteínas HA y NA en menor medida M2, tienen una mayor tasa de evolución que las proteínas PB2, PB1, PA, NP y M1 (Webster *et al.*, 1992).

Las tasas de evolución son diferentes para cada segmento del genoma, lo cual probablemente refleja la diferente presión de selección por parte del huésped para cada proteína. Los genes de la HA y NA del virus pandémico A/H1N1-2009 presentan en promedio una tasa de evolución promedio del genoma de  $3.66 \times 10^{-3}$  cambios/nucleótido/año (Smith *et al.*, 2009) (Wright *et al.*, 2006).

Los análisis filogenéticos han permitido rastrear los orígenes del virus pandémico A/H1N1/2009 (Shinde *et al.*, 2009) (Thifonov *et al.*, 2009).

El virus de influenza también evoluciona por la acumulación de mutaciones que se han ido fijando con el tiempo, a través de selección natural por la interacción con la célula hospedera (coevolución) (Rabadan y Robins 2007).

El ligando que le permite al virus identificar a la célula hospedadora es la HA, misma que en el caso de los virus de influenza aviar es capaz de reconocer como receptor de ácido siálico unido a una molécula por el enlace  $\alpha$ -2-3 galactosa presente en las células del epitelio intestinal de las aves acuáticas; en cambio la HA del nuevo virus A/HN1-2009, reconoce como receptor el ácido siálico unido a la galactosa pero a través de un enlace  $\alpha$ -2-6 que se encuentra en las células del epitelio traqueal humano. La diferencia entre ambas proteínas radica en los aminoácidos localizados en la posición 190 y 225; en el caso de la HA aviar presentan respectivamente una molécula de ácido glutámico y glicina, mientras que la HA de A H1N1 presenta en ambas posiciones dos moléculas de ácido aspártico (Neumann *et al.*, 2009) (Salomon y Webster 2009).

Estos cambios en la secuencia de aminoácidos han permitido que el virus se replique en la tráquea de los pacientes afectados provocando así su rápida dispersión (Neumann *et al.*, 2009).

El uso de antivirales en humanos también ha provocado mutaciones por ejemplo: la resistencia a oseltamivir reportada en virus de influenza estacional A (H1N1); durante los últimos años se ha realizado de manera permanente la vigilancia de

este fenómeno en aislamientos clínicos prácticamente en todas partes del mundo en laboratorios referencia. La resistencia a oseltamivir se evalúa por medio de la detección de la mutación His274Tyr por técnicas de biología molecular y bioinformática (Russell *et al.*, 2006) (World Health Organization, 2009) Ver Figura 5.

Aun cuando se ha postulado que existe cierta inmunidad cruzada hacia las cepas A (H1N1) contenidas en las vacunas estacionales que cambian anualmente, no se ha encontrado evidencia que permita determinar la magnitud de esta respuesta inmune, por lo tanto se ha concluido que las vacunas estacionales no están indicadas para la prevención de la infección por el nuevo virus y que es necesario contar con una vacuna específica (National Institute for Biological Standards and Control 2009).

Una de las medidas más efectivas para la disminución de la incidencia de influenza estacional en humanos, es la aplicación anual de la vacuna trivalente, la cual se produce con los rearrreglantes de los virus que demostraron ser los más prevalentes durante la temporada del año previo (Treanor 2004).

La eficacia de la vacuna contra influenza se ve afectada por la capacidad de cambio viral. La mutación de uno a tres aminoácidos en los sitios antigénicos de HA, reducen la efectividad de las vacunas elaboradas con virus inactivos o virus vivos (Hoffmann *et al.*, 2005). Estos cambios son la principal razón del escape viral a los anticuerpos neutralizantes, haciendo necesaria la vacunación anual contra influenza (Fiore *et al.*, 2009).

Por ejemplo, en el caso de influenza A/Shanghai/11/87 y de A/Victoria/7/87, existe la diferencia de un solo aminoácido, pero estas variantes son antigénicamente distintas debido a que el cambio de aminoácidos resulta en un cambio estructural en el sitio que determina la neutralización de anticuerpos (Lee y Chen 2004).

En el caso del virus de la influenza, las proteínas de superficie del virus, hemaglutinina y neuraminidasa, además de reconocer receptores específicos en las células respiratorias humanas, son los principales antígenos que desencadenan la respuesta inmune humoral. La HA es una glicoproteína trimérica que dependiendo de la cepa, pueden contener de tres a nueve repeticiones de

glicosilaciones N-terminales. Mediante una proteasa específica del hospedero se generan dos péptidos, HA1 y HA2, y los cambios en la secuencia de aminoácidos en el sitio de procesamiento, confieren un incremento en la virulencia del virus (Skehel y Wiley 2000).

En general, la inmunidad inducida por HA aumenta la resistencia del hospedero a la influenza, reduciendo la probabilidad de infección (Chen y Deng 2009).

Una de las maneras en que se ha tratado de mejorar la vacuna estacional, es la de incluir regiones conservadas del virus. De esta manera, las nuevas vacunas contra la influenza basarían su protección tanto en la inmunidad humoral como en la celular (Thomas *et al.*, 2006).

Las vacunas que estimulan la producción de anticuerpos en contra de la glicoproteína HA, especialmente los anticuerpos tipo IgA, son capaces de eliminar al virus y prevenir infección en vías respiratorias altas (Renegar y Small, 1991).

### **El papel del cerdo en la transmisión del virus de influenza**

Los primeros aislamientos de virus de influenza fueron de cerdo en 1930 (Shope 1931). Estos virus mostraron ser antigénicamente similares al virus reconstruido de la epidemia de influenza humana A (H1N1) de 1918, por lo que probablemente se originaron del mismo ancestro (Reid y Taubenberger 2003), (Tumpey *et al.*, 2004).

Desde 1930 hasta los años noventa, la influenza porcina A H1N1 permaneció genéticamente estable y a ese linaje se le ha llamado influenza porcina clásica (Sheerar *et al.*, 1989) (Vincent 2006).

Alrededor de 1998, el virus porcino clásico se reorganizó con el virus H3N2 de la influenza humana de 1968 y con un virus de origen aviar norteamericano de subtipo desconocido, resultando un linaje porcino con triple arreglo ave/cerdo/humano de H3N3 (rH3N2) que estuvo circulando por Estados Unidos y Canadá (Karasin 2000) (Webby 2000) (Zhou 1999).

Poco después de la detección de rH3N2 otros arreglos ocurrieron entre rH3N2 y el virus porcino H1N1. De esa combinación surgieron los virus rH1N1 y rH1N2,

que son los subtipos predominantes que circulan en las poblaciones de cerdos en Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (Vincent 2006), (Vincent 2009).

Estos virus porcinos de triple arreglo norteamericano también han sido detectados en poblaciones de cerdos de Asia (Lee 2008).

El linaje porcino de triple arreglo, tiene una característica común que lo define y es que conserva el origen de los genes que codifican para las seis proteínas internas: PB2 y PA de origen aviar; PB1 de origen humano; y M, NS y NP de origen porcino. A este grupo de genes se le llama casete de arreglo triple de genes internos (TRIG del inglés triple reassortant internal genes) (Vincent 2006).

En los subtipos de este linaje, el casete TRIG se conserva y sólo acepta cambios en los genes que codifican las proteínas de contacto externo con el hospedero que son la HA y NA. Desde la introducción del casete TRIG, se observó un incremento en la deriva antigénica de los virus de influenza porcina de subtipo H1 de Norteamérica. En 2003 y 2004, virus H1N1 y H1N2 con HA y NA tipo humano, se aislaron en Canadá (Vincent 2006) (Karasin 2000).

Esto significa que los virus porcinos que contenían TRIG lo mantuvieron y solo intercambiaron H1 con los de la influenza humana estacional, que son genética y antigénicamente distintos al porcino clásico. Esto demuestra que el cerdo se ha convertido en el reservorio de subtipos H1 intercambiables (Ma *et al.*, 2007).

Los análisis filogenéticos del virus pandémico A H1N1 demostraron que las secuencias de los segmentos (PB2, PB1, PA, HA, NP y NS) fueron similares a los de virus porcinos de triple rearreglo y porcino clásico que circulan en las poblaciones de cerdos de Estados Unidos de Norteamérica, en tanto que, los dos restantes, NA y M, estaban relacionados a los virus porcinos de Euroasia.

La diferencia más notable que mostró este virus con respecto a las zoonosis anteriores, fue la introducción de dos segmentos de origen euroasiático, los segmentos 6 (N) y 7 (M). El cambio de M que es una de las proteínas internas, representa una violación de la conservación del casete TRIG que se había mantenido sin intercambios (Pensaert *et al.*, 1981).

El virus pándemico A/H1N1-2009 pudo haber circulado de manera críptica en cerdos por varios años antes de transferirse a humanos (Smith *et al.*, 2009).

Aunque los virus H1N1 porcinos y humanos todos son en principio de origen aviar, cada uno evolucionó en sus respectivos hospederos dando origen a los linajes clásico porcino y a la influenza humana. La separación de estos linajes puede verse con la anulación de la protección cruzada de anticuerpos contra virus de este subtipo H1N1 de ave, cerdo y humano, así como en las reconstrucciones filogenéticas a partir de la comparación de secuencias de los segmentos del virus (Garten *et al.*, 2009) (Gatherer 2009).

### **Análisis bioinformático y Filogenética Molecular**

Estudios filogenéticos de las secuencias genómicas de decenas de cepas del virus A/H1N1-2009 aisladas en varias partes del mundo, indican que tiene un origen porcino, ya que sus genes están presentes en linajes de virus que han circulado en cerdos cuando menos en los últimos diez años (Garten *et al.*, 2009) (Smith *et al.*, 2009) (Thifonov *et al.*, 2009).

Los estudios filogenéticos realizados sugieren que la transmisión del virus de cerdos a humanos ocurrió en algún momento durante el segundo semestre del 2008, varios meses antes de que se diera la alerta del brote (Fraser *et al.*, 2009) (Smith *et al.*, 2009).

En este sentido, la coevolución del virus y la especie hospedera van delineando la formación de distintos linajes que se ven reflejados en los árboles filogenéticos construidos con secuencias de virus que han sido aislados en escalas de tiempo relativamente cortas (Chang *et al.*, 2009) (Neumann *et al.*, 2009) (Smith *et al.*, 2009).

Las vacunas desarrolladas con base en la bioinformática de miles de secuencias genéticas y en la representación de la variabilidad de sitios neutralizantes de HA o epitopos inmunodominantes de la proteína NP, por medio de péptidos sintéticos permiten ser mas eficaces en la prevención de la enfermedad (Azizi *et al.*, 2008).

## JUSTIFICACIÓN

La pandemia del virus de influenza A/H1N1/2009, la situación actual en aves por el subtipo H7N3 y los reportes recientes de un nuevo virus H3N2 transmitido de cerdos a humanos en Pennsylvania proporciona la oportunidad de diagnosticar, identificar y monitorear los subtipos que se encuentran circulando en cerdos.

El diagnóstico molecular, la secuenciación y el análisis filogenético permite obtener información valiosa sobre las características moleculares particulares de ciertos subtipos virales de influenza, como pueden ser las mutaciones asociadas a la virulencia, resistencia de fármacos o ambas. Asimismo, permite monitorear el surgimiento de nuevos virus que se generan por el intercambio de segmentos génicos completos (rearreglantes).

## HIPÓTESIS

- Mediante la secuenciación genómica de las glicoproteínas de superficie hemaglutinina y neuraminidasa del virus de influenza de aislados en México, se confirmará el nivel de evolución así como la determinación de las características particulares de identidad mediante la aplicación de la bioinformática y el análisis filogenético.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Identificar y determinar la variabilidad genética de la hemaglutinina y neuraminidasa del virus de influenza en cerdos mediante la aplicación de la filogenia.

### Objetivos Específicos

- Secuenciar los segmentos hemaglutinina y neuraminidasa del virus de influenza porcina de diferentes muestras de campo.
- Determinar el nivel de variabilidad de las secuencias obtenidas en nucleótidos y aminoácidos.
- Determinar mediante la bioinformática y el análisis filogenético el patrón de evolución de las muestras positivas en relación a otras secuencias en la base de datos.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de muestras

Nuestro grupo de trabajo colectó un total de 1246 muestras en rastros de 18 estados de la República Mexicana, durante el periodo 2009-2011, en donde Avalos *et al.*, 2012 reportaron un total de 791 muestras positivas al virus de Influenza mediante la identificación del gen M por RT-PCR Tiempo Real. De estos se eligieron 33 muestras incluyendo en el proyecto de secuenciación genómica los virus referencia A/swine/NewJersey/11/76 (H1N1) y A/swine/NewJersey/11/76 (H3N2) replicados en embrión de pollo SPF (Cuadro 1).

El estudio se realizó en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM).

### Extracción de RNA genómico viral

A partir de las muestras clínicas y los virus referencia, se extrajo el RNA viral con TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen Cat. No. 15596-018), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Chomczynski y Sacchi 1987).

### Transcriptasa Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La presencia de RNA correspondiente al virus de influenza se verificó mediante la subtipificación (H1N1, H3N2) con una RT-PCR (One Step RT-PCR Kit, Quiagen<sup>®</sup>, Valencia, CA; Cat. No. 210212) con oligonucleótidos específicos descritos por Choi *et al.*, 2002, para amplificar las hemaglutininas H1, H3 y las neuraminidasas N1, N2. El protocolo de amplificación incluyó los siguientes tiempos y temperaturas: 50°C por 30 min, 95°C por 15 min, como temperatura de pre-desnaturalización por un ciclo; cuarenta ciclos desnaturalización a 94°C por 30

seg., alineación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, extensión final 72°C por 7 min, en el MultiGene Thermal Cyclers (Labnet International, Inc.)

### **RT-PCR Multisegmento**

De manera complementaria se realizó una RT-PCR multisegmento (M-RTPCR), para amplificar el genoma completo utilizando oligonucleótidos universales específicos para influenza, que son complementarios a los extremos 3' y 5' conservados de cada uno de los segmentos génicos (MBTuni-12 5ACGCGTGATCAGCAAAGCAGG3, MBTuni-13 5ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG 3) reportados por Zhou *et al.*, 2009. Se utilizó el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq DNA polymerase, (Invitrogen Cat. No. 12574-026) bajo el siguiente protocolo de amplificación: 42°C 60 min, 94°C 2 min, (94°C 30 seg, 45°C 30 seg, 68°C 3 min) X 5 ciclos (94°C 30 seg, 57°C 30 seg, 68°C 3 min) por 31 ciclos.

### **Secuenciación**

Los productos de RT-PCR fueron purificados mediante el kit QUIAquick® Gel Extraction (Quiagen, Hilden, Germany Cat. No. 28106). El material genético purificado se cuantificó en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC), la PCR de secuenciación se elaboró con el Kit Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Cat. No. 4337455 ) los productos fueron purificados mediante CENTRI-SEP™ Spin Columns (Princeton Separations Cat. No. CS-901), las muestras se concentraron mediante el Concentator 5301 (Eppendorf Germany) y la lectura del electroferograma se realizó en el Analizador Genético 3130 (Applied Biosystems).

## Edición de las secuencias

La edición de las secuencias se realizó mediante el software ChromasPro versión 1.5 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) posteriormente, para confirmar que las secuencias obtenidas correspondieran al Virus de Influenza se realizó un análisis Basic Local Alignment Search Tool en nucleótidos (BLASTn) y en aminoácidos (BLASTp) para identificar aquellas secuencias en nucleótidos con un alto porcentaje de similitud (Lipman 1990).

La transformación de las secuencias obtenidas en aminoácidos se realizó mediante la búsqueda de ATG como codón de inicio Open Reading Frame (ORF) en la página del National Center for Biotechnology Information (Tatusov y Tatusova 1988).

Para este trabajo se tomó la definición de SNP como una variación en una secuencia de bases que ocurre en cualquier posición del genoma (Futuyma 1998).

## Análisis Filogenético

Las secuencias se alinearon mediante el algoritmo Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT) (Katoch *et al.*, 2009).

El análisis evolutivo se diseñó bajo el método estadístico de máxima verosimilitud (ML) con el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5), (Tamura *et al.*, 2011) test filogenético bootstrap 1000 repeticiones (Felsenstein 1985).

Los árboles de ML se infirieron con el mejor modelo de inferencia evolutivo Bayesian Information Criterion (BIC) obteniendo para H3 nct y N1 nct *Tamura 3-parameter+Gamma distribution (T92+G)*, H3 aa N1 aa *Jones Taylos Thorton+Gamma distribution (JTT+G)* N2 nct *Kimura 2-parameter (K2)* N2 aa *Whelan and Goldman+Gamma distribution (WAG+G)* para el soporte de las ramas (Schwarz 1978).

Mediante el alineamiento de las secuencias se identificaron los sitios variables y conservados de las secuencias obtenidas.

Debido a la importancia de la enfermedad en la salud pública y para determinar el probable nivel de similitud se incluyeron las siguientes secuencias del virus de influenza pandémicas identificadas recientemente en humanos y cerdos con la siguiente nomenclatura A/Humano/California/2009 (H1N1), A/Humano/MéxicoLaGloria/2009 (H1N1), A/Humano/MéxicoCity/2009 (H1N1), A/Cerdo/Querétaro/2009 (H1N1), A/Humano/MéxicoInDRE/2010 (H1N1), A/Humano/MéxicoInDRE/2011 (H1N1), A/Humano/MéxicoInDRE/2012 (H1N1), A/Humano/Indiana/2011 (H3N2), A/Humano/Pennsylvania/2011 (H3N2), A/Cerdo/Iowa/2011 (H3N2), A/Cerdo/Minnesota/2011 (H3N2) (cuadro 2).

## RESULTADOS

### Subtipificación mediante One Step RT-PCR

A partir de las muestras colectadas en rastros, se realizó el diagnóstico molecular mediante la técnica de One Step RT-PCR para identificar el subtipo viral, donde se identificó 14 amplicones obtenidos fueron clasificados como neuraminidasa N1, solo se logró determinar la presencia de la hemaglutinina H3 del virus referencia A/swine/NewJersey/11/76 (H3N2) y 3 muestras fueron positivas para la neuraminidasa N2. En el control positivo A/Cerdo/DMZC/11 H1N1 no se identificó la H1; también las muestras clínicas fueron negativas.

Las muestras de semen identificadas como A/Cerdo/Estado de México/48/09 y A/Cerdo/Estado de México/49/09 resultaron positivas al virus de influenza subtipo N1; mientras que las muestras A/Cerdo/Estado de México/50/09 y A/Cerdo/Estado de México/51/09 fueron positivas para ambos subtipos N1 y N2 identificando una infección mixta por diferentes subtipos de neuraminidasas (Cuadro 1).

### Identificación del Virus de Influenza mediante RT-PCR Multisegmento

La técnica de RT-PCR multisegmento se aplicó de manera complementaria en donde se identificaron nueve muestras positivas, lo que representa un 27% del total de las muestras. Por esta metodología se identificaron 3 muestras positivas al virus de influenza que no fueron identificadas por la técnica de One Step RT PCR. Los segmentos HA, NP, NA, M, NS se identificaron en la muestra A/Cerdo/Veracruz/37/09 mientras que en las muestras A/Cerdo/Estado de México/19/09/N1, A/Cerdo/Estado de México/51/09/N1, A/Cerdo/Estado de México/52/09/N1, A/Cerdo/DMZC/11/H1N1, A/Cerdo/DMZC/11/H3N2 A/Cerdo/Veracruz/29/09, A/Cerdo/Veracruz/31/09/N1, A/Cerdo/Querétaro/35/09 únicamente amplificaron los segmentos M y NS.

## **Similitud BLASTn secuencias en nucleótidos**

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación se realizó un análisis BLASTn en donde se identificaron las secuencias con mayor porcentaje de homología encontrando que para la neuraminidasa N1 del virus de referencia se presentó un elevado porcentaje de similitud a los virus de influenza de Norteamérica que circularon previamente en aves y cerdos (Cuadro 3).

Respecto a las muestras clínicas positivas al virus de influenza identificadas como N1 se observó que presentaban una elevada similitud a virus porcinos que circularon en años pasados en Norteamérica, sin embargo existió también similitud con virus aviares identificados a finales de los años 80s y principios de los 90s. Durante esta época se identificó un virus similar en Hong Kong así como la presencia del subtipo H3N1 en cerdos de Norteamérica (Cuadro 4).

En la mayoría de las secuencias identificadas como H3 del virus de referencia se presenta una elevada similitud de afinidad a virus de influenza de humanos y cerdos, mientras que existe una marcada diversidad respecto a la región geográfica principalmente Americana, seguida de la Europea y Asiática (Cuadro 5).

En el segmento N2 del virus referencia existe la presencia del subtipo H1N2, así como también una gran diversidad de huéspedes como cerdo, humano y pato; los principales continentes involucrados son América y Asia (Cuadro 6).

## **Similitud BLASTp en secuencias en aminoácidos**

Los resultados obtenidos mediante el análisis BLASTp de las secuencias en aminoácidos para el segmento N1 identifican dos secuencias con un elevado grado de similitud pero que pertenecen al subtipo H3N1 donde el huésped principal es el cerdo y la región geográfica Asia (Taiwán) (Cuadro 7).

La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica de las

muestras clínicas presentan afinidad para huéspedes porcinos en donde la región geográfica predominante es Estados Unidos y Asia, compartiendo una homología a virus H1N1 (Cuadro 8).

La similitud del segmento H3 presenta uniformidad del subtipo H3N2, siendo los huéspedes aves, cerdos y humanos, las regiones geográficas están representadas por América, Europa y Asia (Cuadro 9).

La afinidad de la secuencia N2 representa una elevada similitud a secuencias de subtipos H1N2 y H3N2, así como virus que se han identificado en humanos, cerdos y aves en Norteamérica y Asia principalmente (Cuadro 10).

### **Secuenciación genómica en los virus referencia**

La identificación de SNPs en los virus de referencia fueron determinadas encontrando para A/Cerdo/DMZC/11/N1 una lectura total en el electroferograma de 576 nt, lo que corresponde al 40.85% de cobertura total del segmento N1. Una vez transformada la lectura en aminoácidos, se obtuvieron 178 aa lo que corresponde a un 37.95% de cobertura. Se identificaron 29 SNPs en nt y 5 cambios en aa en las posiciones 255, 265, 267, 270, 289, respectivamente.

En la secuencia obtenida de la muestra A/Cerdo/DMZC/11/H3 se obtuvo una lectura total del electroferograma de 666 nct, lo que corresponde al 49.6% de cobertura total del segmento H3; transformada la secuencia en aminoácidos, se obtuvieron 218 aa lo que corresponde 49.77% de cobertura. Se identificaron 10 SNPs en nt y 7 cambios en aa en las posiciones 28, 72, 79, 153, 158, 225, 230, además se identificó en esta muestra en la posición 226 de aminoácidos a la glutamina; y en la posición 228 a la treonina lo que sugiere la afinidad a receptores aviares (Figura 6).

Finalmente, para el virus A/Cerdo/DMZC/11/N2 se obtuvo una lectura del electroferograma de 382 nt lo que corresponde al 27.5% de cobertura total del segmento N2. Una vez transformada en aminoácidos, se obtuvieron 119 aa lo que representa un 25.7% de cobertura total; no se identificaron cambios evolutivos.

## **Secuenciación genómica en muestras clínicas**

Se obtuvieron ocho electroferogramas de las muestras de campo identificadas con la siguiente nomenclatura: A/Cerdo/Veracruz/0/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/1/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/2/09/N1, A/Cerdo/Oaxaca/20/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/49/09/N1, A/Cerdo/Veracruz/31/09/N1 el tamaño total obtenido mediante el electroferograma fue de 490 nct lo que representa 34.7% nct. Una vez transformada en aminoácidos, 160 aa de longitud, lo que representa 34.1% aa; mientras que para las secuencias identificadas como A/Cerdo/Veracruz/19/09/N1 y A/Cerdo/Veracruz/50/09/N1 la lectura obtenida mediante el electroferograma fue de 634 nct lo que representa un 44.9% del tamaño total del segmento N1. Transformada la secuencia en aminoácidos, se obtuvieron 192 aa de longitud; lo que representa un total de 40.9% de longitud. Las ocho muestras clínicas presentaron un cambio de histidina por tirosina en la posición 274, lo que implica la resistencia al antiviral oseltamivir (Figura 7).

## **Árboles Filogenéticos en Nucleótidos**

Los virus identificados en este trabajo como N1 se encuentran en el árbol filogenético en dos clados; en el primero se presentan los virus secuenciados y obtenidos a partir de las muestras clínicas, además se observó que existe un virus muy similar que presenta una hemaglutinina diferente H3 (A/Cerdo/USA/(H3N1). En este cluster se encuentran virus de influenza de cerdos que circularon con anterioridad en Norteamérica, estos taxones descienden del virus A/Pavo/1988/H1N1.

En el mismo clado se agrupan los virus referencia identificados como A/Cerdo/NewJersey/1976(N1) y A/DMZC-UNAM/11/N1 en donde dentro de la cobertura secuenciada existen 29 cambios en nucleótidos; por lo que se observan ubicados en un cluster diferente,



En el segundo clado se observan los virus pandémicos que circularon en México en la pandemia del 2009 (A/Humano/California/2009(H1N1)); así como el primer virus identificado y secuenciado en el cerdo durante ese periodo (A/Cerdo/Querétaro/2009(H1N1)) (Figura 8).

La diferencia entre los virus A/cerdo/Minnesota/98/(H3N2) y A/DMZC-UNAM/2011/H3 en las secuencias obtenidas es de 10 nucleótidos, que permiten se identifiquen dentro del mismo cluster. Los virus que actualmente circulan en cerdos y humanos como H3N2 en Estados Unidos se encuentran ubicados en otro clado (Figura 9).

En los virus referencia A/Cerdo/Minnesota/1998(H3N2) y A/Cerdo/DMZC-UNAM/2011/N2 no se presentaron SNPs en su genoma viral, por lo que se encuentran ubicados en el mismo clado y cluster; además tienen una similitud a virus de porcinos de Norteamérica aunque se encuentran ubicados en este cluster virus aviares de pato y pavo (Figura 10).

### **Árboles Filogenéticos basado en aminoácidos**

En el segmento identificado como N1 de las muestras de campo existen dos clados y nueve clusters, en el primer clado se encuentran los virus porcinos secuenciados con gran similitud a virus estacionales porcinos y aviares, sin embargo las secuencias obtenidas de las muestras clínicas tuvieron un grado de divergencia muy relacionado a virus de cerdo asiáticos que fueron identificados en 2001 y 2003; además que pertenecen a un subtipo diferente H3N1.

En el segundo clado se ubican los virus pandémicos secuenciados en humanos y cerdos.

Respecto a los virus referencia A/Cerdo/NewJersey/1976(N1) y A/DMZC-UNAM/11/N1 presentaron 5 cambios en las posiciones Leu255Ile, Arg265Lys, Ile267Val, Asp270Asn y Val289Met lo que ocasionó se le ubicara en otro cluster (Figura 11).

Por otra parte, la filogenia para la hemaglutinina H3 presentó 2 clados y 6 clusters. En el primer clado se encuentran predominando virus porcinos de Norteamérica; además de un virus de pato, en los otros clusters se encontraron virus H3N2 en donde existen secuencias obtenidas a partir de cultivos celulares. En el segundo clado se ubican virus humanos y porcinos subtipo H3N2.

En tanto que los virus de referencia *A/cerdo/Minnesota/98/(H3N2)* y *A/DMZC-UNAM/2011/H3* presentaron 7 cambios en las posiciones Thr28Met, Gln72His, Asn79Ser, Tyr153Asn, Gly158Glu, Asn225Ser, Ile230Asn lo que dio origen a su ubicación en un cluster diferente (Figura 12) (Cuadro 14).

La filogenia en el segmento N2 presentó dos clados; en el primero se encontraron los virus estacionales que circularon en cerdos. Algunos virus son similares aunque pertenecen a otro subtipo H1N2; y no presentaron cambios en su secuencia los virus *A/Cerdo/Minnesota/1998(H3N2)* y *A/Cerdo/DMZC-UNAM/2011/N2*, de manera que se encuentran en el mismo cluster perteneciendo al mismo linaje. En el otro clado se encuentran los OTUs que pertenecen a virus H3N2 de cerdos y humanos (Figura 13).

## DISCUSIÓN

El diagnóstico molecular y la interpretación de los resultados son herramientas indispensables para la toma de decisiones para el control y tratamiento de la enfermedad por el virus de influenza. El método de extracción así como la cuantificación de RNA viral específico es importante para determinar la sensibilidad de la prueba, se ha determinado que la técnica de One Step RT-PCR Múltiple presenta una sensibilidad de 10TCID<sub>50</sub>/ml detectando concentraciones virales bajas de 1TCID<sub>50</sub>/ML en muestras de campo de cerdos en Korea para los segmentos H1, H3, N1, N2 (Lee 2008).

El diagnóstico dirigido al virus de influenza debe contemplar la detección de segmentos que presenten un menor grado de variabilidad respecto a las glicoproteínas de superficie, para identificar en primer término segmentos conservados que presenten una menor tasa de mutación o evolución. En Alemania para determinar la prevalencia del virus de influenza en cerdos salvajes identificaron la proteína M en 242 muestras de pulmón, obteniendo que 0.8% fueron positivas. Los resultados indican una baja identificación del virus respecto a granjas porcinas tecnificadas en donde la prevalencia del virus es más elevada (Kaden 2008).

La identificación del virus de influenza en cerdos mediante la técnica de One Step RT-PCR Múltiple ha sido reportada en Corea, en donde a partir de 5 hisopos nasales y 70 muestras clínicas de pulmón; detectaron tres muestras positivas para H1N1 (4%), cinco para el subtipo H1N2 (6.6%) y una muestra positiva para H3N2 (1.3%). Es importante señalar que en este trabajo se utilizó el mismo “set” de “primers” y además se concluye que existe una cercana relación filogenética con virus H1N1 de Estados Unidos, lo que sugiere una transmisión del virus de influenza a cerdos de Korea (Lee *et al.*, 2007). Los resultados indican una baja prevalencia del virus de influenza estacional en cerdos además se identifica que las muestras secuenciadas presentan una elevada similitud de virus con linaje norteamericano.

Es evidente la circulación del virus de influenza estacional en cerdos basado en reportes de Estados Unidos, en donde de un total de 9,400 hisopos nasales obtenidos en rastros, 478 (5.1%) fueron positivos. En un segundo estudio, de 1,200 muestras, 26 (2.2%) fueron positivas. Estas frecuencias fueron relativamente bajas en comparación con países europeos como Bélgica, Inglaterra, Italia, Francia y España, en donde durante 3 años colectaron muestras en época de invierno y primavera, identificando 169 virus de influenza. De estos el 81.9% de virus identificados que provenían de cerdos de 6 meses o más jóvenes; sin embargo en Hong Kong de 4957 hisopos de tráquea, 184 (3.7%) fueron positivos. En Taiwán, de 881 hisopos nasales el 7 (0.79%) fueron positivos identificando el segmento de la nucleoproteína mediante RT-PCR Tiempo Real. Estas frecuencias muy bajas y similares a los estudios realizados en Norteamérica (Torremorell *et al.*, 2011).

Comúnmente se señala que los cerdos transmiten el virus de influenza a humanos debido a que los subtipos que circulan entre ambas especies son muy similares. Para determinar esta relación, en un estudio en China se colectaron 450 muestras de hisopos nasales y pulmones en granjas de cerdos con signología clínica respiratoria, así como 90 hisopos nasofaríngeos en humanos enfermos; determinando que no existe correlación genética entre los virus de influenza subtipo H3N2 del 2005 humano y los virus que circularon con anterioridad en cerdos durante el periodo de 1990 al 2000. Se propone que el virus de influenza en cerdos necesita un mínimo de 5 años de adaptación para convertirse en un virus prevalente. Lo que se confirma mediante los resultados de análisis filogenéticos realizados ubicando los taxones en un clado diferente (Liu *et al.*, 2009).

Existen informes en donde la evolución antigénica de virus H3N2 porcinos es seis veces más baja que en humanos (de Jong 2007); lo que coincide con nuestros resultados, en donde los virus de influenza en cerdos secuenciados se ubican en un clado diferente de los virus pandémicos humanos y porcinos.

Los virus porcinos identificados presentan un elevado porcentaje de similitud en las secuencias en nucleótidos a virus norteamericanos porcinos; mientras que respecto a las secuencias en aminoácidos, el grado de divergencia es menor a virus de influenza porcinos asiáticos, en las glicoproteínas de superficie hemaglutinina y neuraminidasa.

Es común que dentro de la rutina de trabajo en los laboratorios se realice la replicación viral a partir de muestras de campo en embrión de pollo para posteriormente realizar estudios de secuenciación genómica; sin embargo, un solo cambio de un aminoácido puede ocasionar efectos pleotrópicos y de antigenicidad viral. La replicación del virus referencia A/NJ/11/76(H1N1) presentó un cambio en el residuo Gly158Glu, determinándose como un cambio funcional biológico fortuito ya que en la naturaleza existía este cambio (Both *et al.*, 1983). La replicación viral en embrión de pollo depende también del sitio de inoculación, se ha demostrado que de manera inicial el crecimiento del virus en la cavidad amniótica incrementa o permite una replicación eficiente en la cavidad alantoidea y que al menos son necesarios tres pases en la cavidad amniótica para obtener una mejor replicación en la cavidad alantoidea para posteriormente realizar varios pases (Widjaja *et al.*, 2006). Por lo tanto cuando el objetivo sea determinar los cambios evolutivos del virus de influenza es conveniente realizarlo a partir de las muestras clínicas directamente.

La bioseguridad dentro de una granja de cerdos es de vital importancia para el control de enfermedades, aunque también resulta indispensable identificar las rutas o áreas de mayor densidad de explotaciones porcícolas así como sus vías de comunicación. Con la finalidad de monitorear que subtipos se encuentran en una región y de esta manera entender la dinámica de infección del virus de influenza. En Estados Unidos se colectaron 1,516 muestras del año 2003 al 2010 y determinaron que la circulación es del sureste al centro-oeste, lugar donde se importan millones de cerdos anualmente, además de identificar que el subtipo H1 fue introducido a los cerdos a partir del humano durante el 2003. En este estudio

encontraron que el subtipo H1N2 se disemina del centro-sur al Oeste confirmando que los virus que circulan en cerdos provienen de humanos, ya que se encontró que los árboles filogenéticos de estos aislados fue un virus humano (Nelson *et al.*, 2011).

Respecto a la probable relación entre el virus pandémico A/H1N1/2009 en China, se señala que durante los pasados cinco años han circulado virus rearrreglantes H1N1 y H3N2 aviares y humanos, sin embargo no existe una evidencia o correlación entre el virus pandémico A/H1N1/2009 y los virus que circulan en cerdos de China (Lu *et al.*, 2010).

La caracterización genética y el análisis filogenético de los virus pandémicos A/H1N1/2009 los diferenciaron en dos grupos o clusters (Fereidouni *et al.*, 2009) y en siete diferentes subclados definidos (Nelson *et al.*, 2009). Dentro del cluster 1 Texas 248N (asparginina) se encuentran los resultados de las muestras identificadas como N1 en cerdos de México como California 2009 A/Humano/California/2009, A/Humano/MéxicoLaGloria/2009, A/Cerdo/Querétaro/2009 ubicados en el cluster 2, New York presenta 248D (ácido aspártico) en donde se encuentran los virus A/Humano/MéxicoCity/2009, A/Humano/MéxicoInDRE/2010, A/Humano/MéxicoInDRE/2011, A/Humano/MéxicoInDRE/2012. Sin embargo los virus pandémicos identificados en el cluster 1 no se encuentran en el mismo clado dentro de la filogenia presentada para este segmento, lo que sugiere que no existe una correlación evidente del segmento secuenciado en las muestras clínicas de cerdos en México.

Se ha reportado un set de oligonucleótidos para identificar los nueve diferentes subtipos del virus de influenza A (aves, humanos y cerdos) esta técnica identificó 200 muestras positivas de aves silvestres así como muestras de referencia porcinas y humanas; posteriormente, se realizó la secuenciación de las muestras con una lectura del electroferograma de 500 pb (Goyal 2010). De esta manera se puede identificar de manera general los diferentes subtipos de

Es poco común la identificación del virus de influenza en los sementales de centros de transferencia genética de manera que si la dosis de semen es positiva al virus de influenza; esta puede ser transmitida al momento de inseminar a las cerdas y de esta manera diseminar las enfermedades infecciosas, lo que repercute en pérdidas económicas de manera particular (Guérin y Pozzi 2005).

El análisis del gen M mediante la técnica de RT PCR Tiempo Real a partir de 60 hisopos nasales procedentes de hembras de pie de cría no fue identificado; mientras que en neonatos de 3-11 días de edad las muestras fueron positivas (Allerson *et al.*, 2011).

Los fluidos orales en humanos son utilizados para la detección viral, detección de anticuerpos, monitoreo de fármacos y niveles de hormonas. En cerdos son recientemente utilizados para el monitoreo del virus de PRRS, por lo que puede ser una eficaz alternativa para monitorear grupos de animales infectados por el virus de influenza (Detmer *et al.*, 2010) (Brown *et al.*, 2012).

La principal práctica en campo para el control del virus de influenza en cerdos es la aplicación de las vacunas comerciales dirigidas a los tres principales subtipos estacionales que circulan en cerdos (H1N1, H3N2 y H1N2) seguida de la aplicación de antibióticos para controlar agentes secundarios bacterianos. No es convencional la aplicación de fármacos antivirales como es el caso en humanos; sin embargo es necesario identificar los cambios en la posición 274 para identificar si los virus de porcinos presentan este cambio cuando se llegue a presentar una infección interespecies para tomar decisiones importantes con las medidas de control y tratamiento adecuado (Brockhoff 2010).

La construcción de árboles filogenéticos se ha realizado para detectar las recombinaciones de virus con genoma segmentado (Suzuki 2010). La manera más evidente de identificar un nuevo subtipo viral es mediante la técnica de secuenciación. En España se confirmó la presencia del subtipo H1N2 en el 2006

mediante esta técnica además de identificar los cambios evolutivos en su secuencia de aminoácidos (Maldonado 2006).

Del periodo 2006 al 2009 se analizaron 469 secuencias completas de HA y NA de (327 humano, 104 de porcinos y 38 aviares), encontrando  $2.6 \times 10^{-3}$  para H1 y  $2.4 \times 10^{-3}$  N1 nucleótidos de sustitución por sitio/año. En este estudio se concluye que la transmisión interespecies es rara especialmente entre humanos y aves, confirman que el cerdo es el principal amplificador de los virus de influenza (Haß *et al.*, 2011).

Recientemente Furuse *et al.*, 2010, analizó 116 secuencias de virus de influenza pandémico A/H1N1/2009 (marzo-diciembre 2009) identificando una tasa de evolución de  $0.9 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año, 1457 secuencias de virus H1N1 humanos estacionales de 1918 a 1957 determinando una tasa de evolución de  $2.9 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año y del periodo de 1977 al 2009 una tasa de evolución de  $1.7 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año. Las 365 secuencias analizadas para el subtipo H1N1 porcino determinaron una tasa de evolución de  $1.9 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año de 1930 al 2009. Se observó que la presión de selección en el cerdo es más baja y depende del tipo de huésped.

El virus H1N1/2009 tiene una presión de selección similar con los virus estacionales H1N1 humanos, y donde la adaptación a un nuevo huésped puede incrementar la presión de selección. La evolución antigénica de los virus porcinos ocurre más lentamente que los virus humanos aunque los cambios evolutivos antigénicos son muy similares para ambos huéspedes.

La presión de selección de los virus porcinos H1 es menor que la de los virus H1 estacionales y muy equivalente a 1977 a 2009. Esta podría ser una consecuencia de que la presión de selección sea más baja, ya que afecta las propiedades antigénicas de la HA en cerdos. La mayoría de los cerdos se sacrifican a los 6 meses de edad y la población de cerdos es constantemente reemplazada por lo tanto, la población de cerdos susceptibles cambia continuamente limitando al



sistema inmune razón por la cual la evolución del virus de influenza porcina se dirige a la deriva antigénica (Furuse *et al.*, 2010).

En México durante la pandemia de influenza por el virus A/H1N1/2009 solo existe un reporte de este virus identificado en cerdos en la base de datos del NCBI con el número de acceso ADA72003 lo que sugiere la baja prevalencia de este virus en granjas de cerdos.

Es evidente la transmisión del virus de influenza entre diferentes especies, sin embargo los virus identificados en cerdos de México durante el periodo 2009-2011 presentan una similitud a virus de cerdos que circularon en años anteriores en Norteamérica por lo que no tiene una similitud con virus pandémicos identificados en humanos y cerdos de México durante el periodo 2009-2011.

## CONCLUSIONES

- La técnica de M-RT PCR puede utilizarse como una técnica “screening” para la identificación del virus de influenza.
- La técnica de One Step RT-PCR puede identificar virus de influenza porcina en muestras de semen.
- Una muestra positiva mediante una prueba screening debe realizarse de una técnica diagnóstica que identifique el subtipo.
- Una muestra puede ser positiva a dos subtipos del virus de influenza.
- El análisis de las secuencias en aminoácidos debe de realizarse en la identificación de posiciones de interés para determinar la afinidad de receptores por tipo huésped y la resistencia a antivirales. Esto podría ayudar a realizar otras técnicas como la pirosecuenciación para un análisis más rápido en la detección de SNPs.
- Es necesario el uso de la secuenciación y la bioinformática para determinar los posibles cambios evolutivos o mutaciones para determinar el nivel de nivel de las muestras secuenciadas.

## REFERENCIAS

- Allerson *et al.* (2011). The disease ecology of influenza virus in swine breeding farms. In A. A. Veterinarians (Ed.). Phoenix, Arizona: 42nd Annual Meeting Proceedings.
- Azizi A, Anderson D, Torres J, *et al.* (2008). Induction of broad cross-subtype-specific HIV-1 immune responses by a novel multivalent HIV-1 peptide vaccine in *cynomolgus macaques*. *J Immunol.* 180, 2174-2186.
- Both GW, Shi CH, Kilbourne ED. (1983). Hemagglutinin of swine influenza virus: A single amino acid change pleiotropically affects viral antigenicity and replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 6996-7000.
- Bouvier NM, Palese P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 4, 49-53.
- Brockhoff E. (2010). Clinical presentation and epidemiology of human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. Omaha, Nebraska: 41st Annual Meeting Proceedings American Association of Swine Veterinarians.
- Brown IH. (1994). Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Vet Microbiol*, 39, 1125-134.
- Brown WS, Zimmerman J, Karriker L, Schwartz K, Rademacher C, *et al.* (2012). Detection of PRRSV and SIV in oral fluids from pigs one week postweaning. Denver Colorado: 43rd Annual Meeting Proceedings American Association of Swine Veterinarians.
- Butler D. (2009). Vaccine decisions loom for new flu strain. *Nature* 459.
- Butt KM, Smith GJ, Chen H, *et al.* (2005). Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol* 43, 5760-5767.
- Chang LY, Shih SR, Shao PL, Huang DT, Huang LM. (2009). Novel swine origin influenza virus A (H1N1): the first pandemic of the 21st century. *J Formos Med Assoc*, 108, 526-532.

- Chen J, Deng YM. (2009). Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virology*, 6.
- Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW and Joo HS. (2002). Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods*, 102, 53-59.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. (1994). Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 205, 17-23.
- Couciero JN, Paulson JC, Baurri LG. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res*, 29, 155-165.
- Cox NJ, Fuller F, Kaverin N, Klenk HD, Lamb RA, Mahy W, *et al.* (2000). *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, 585-597.
- De Jong JC, S. D. (2007). Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol*, 81, 4315-4322.
- De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, *et al.* (2006). Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* (10), 1203-1207.
- Detmer SE, Patnayak DP, Gramer RM, Goyal SM. (2010). Detection of swine influenza virus (SIV) in porcine oral fluid samples. (99-102). Omaha, Nebraska: American Association of Swine Veterinarians.
- Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, *et al.* (2009). Infections with oseltamivir resistant influenza A (H1N1) virus in the United States. *J AM Med Assoc* 10, 1034-1041.
- Doherty PC, Turner SJ, Webby RG, Thomas PG. (2006). Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol.* 5, 449-455.

- Drake JW. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc Natl Acad Sci USA 9, 4171-4175.
- Du Q, Wang S, Huang R, Chou K. (2010) Computational 3D structures of drug-targeting proteins in the 2009-H1N1 influenza A virus. Chem Phys Lett. 485, 191-195.
- Felsenstein F. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39, 783-791.
- Fereidouni SR, Beer M, Vahlenkamp T, Starick E. (2009). Differentiation of two distinct clusters among currently circulating influenza A (H1N1) viruses, March-September 2009. Euro Surveill, 14.
- Fiore AE, Shay DK, Broderick, *et al.* (2009). Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Recomm Rep 58, 1-52.
- Fitch WM, Leiter JM, Li XQ, Palese P. (1991). Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. Proc Natl Acad Sci USA, 88, 4270-4274.
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, *et al.* (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc Natl Acad Sci USA. 5, 1356-1361.
- Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, *et al.* (2009). Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. Science. 5934, 1557-1561.
- Furuse Y, Shimabukuro K, Odagiri T, Sawayama R, Okada T, *et al.* (2010). Comparison of selection pressures on the HA gene of pandemic (2009) and seasonal human and swine influenza A H1 subtype viruses. Virology. 405, 314-321.
- Futuyma, D. (1998). In Evolutionary Biology (3rd ed). Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates.
- Gallaher WR. (2009). Towards a sane and rational approach to management of influenza H1N1 2009. J Virol. 51.

- Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y. (2008). Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet*, 371, 1464-1475.
- Garten RJ, Davis CT, Rusell CA. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201.
- Gatherer D. (2009). The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* 45, 174-178.
- Goyal SM, C. Y. (2010). Full length sequencing of all nine subtypes of the neuraminidase gene of influenza A viruses subtype specific primer sets. *J Virol Methods*, 165, 116-120.
- Guérin B, Pozzi N. (2005). Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology*, 63, 556-572.
- Guo YJ, Jin FG, Wang M, Zhu JM. (1983). Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol*, 64, 177-182.
- Haß J, Matuszewski S, Cieslik D, Haase M. (2011). The role of swine as "mixing vessel" for interespecies transmission of the influenza A subtype H1N1: A simultaneous Bayesian inference of phylogeny and ancestral hosts. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 437-441.
- Hoffmann E, Lipatov AS, Webby RJ, Govorkova EA, Webster RG. (2005). Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 12915-12920.
- Horimoto T, Kawaoka Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3, 591-600.
- Ito T, Couciero JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*, 72, 7367-7373.

- Ito T, Kawaoka Y. (2000). Host range barrier of influenza A viruses. *Vet Microbiol*, 74, 71-75.
- Kaden V, L. E. (2008). Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. *Vet Microbiol*, 131, 123-132.
- Karasin AI, B. I. (2000). Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol*, 74, 9322-9327.
- Karasin AI, S. M. (2000). Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America. 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* (68), 71-85.
- Karasin AI, (2004). Characterization of Avian H3N3 and H1N1 Influenza A Viruses Isolated from Pigs in Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4349-4354.
- Katoh K, Asimenos G, Toh H. (2009). Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. In D. Posada, *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis* (Vol. 537, pp. 39-64). 537: *Methods in Molecular Biology*.
- Kawaoka Y, Webster RG. (1988). Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (85) 324-328.
- Kilbourne ED, Couch RB, Kasel JA. (1995). Purified influenza A virus N2 neuraminidase vaccine is immunogenic and non toxic in humans. *Vaccine* (18), 1799-1803.
- Lamb RA, Klug RM. (2006). In *Fundamental virology* (3rd ed., pp. 605-647). Philadelphia: Lippincott Raven.
- Lee CS, K. B. (2008). One-Step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *Journal of Virological Methods*, 151, 30-34.
- Lee Cs, K. B. (2008). Phylogenetic analysis of swine influenza viruses recently isolated in Korea. *Virus Genes* (37), 168-176.

- Lee CS, Song DS, Lee CS, Jung K, Kang BK, Oh JS, Yoon YD, Lee JH, Park BK. (2007). Isolation and phylogenetic analysis of H1N1 swine influenza virus isolated in Korea. *Virus Research*, 125, 98-103.
- Lee MS, Chen JS. (2004). Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg Infect Dis* (8), 1385-1390.
- Lipman, A. S. (1990, Oct 5). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), 403-410.
- Liu W, Sun L, Zhang G, Shu Y, Chen X, *et al.* (2009). Genetic correlation between H3N2 human and swine influenza viruses. *Journal of Clinical Virology*, 44, 141-144.
- Lu L, Yin Y, Sun Z, Gao L, Gao GF, Liu S, Sun L, Liu W. (2010). Genetic correlation between current circulating H1N1 swine and human influenza viruses. *J Clin Virol*.
- Ma W, Vincent AL, Gramer MR, Brockwell CB, Larger KM, Janke BH, *et al.* (2007). Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc Natl Acad Sci USA* (104), 20949-20954.
- Ma W, Kahn R, Richt J. (2009) The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J Mol Genet Med* 3 (1), 158-166.
- Maldonado J, V. R. (2006). Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *The Veterinary Journal*, 172, 377-381.
- Matrosovich M, T. A. (2000). Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 74, 8502-8512.
- Medina RA, Garcia Sastre A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews/Microbiology*, 9, 590-603.
- Moreno A, B. I. (2009). Novel swine influenza virus subtype H3N1 in Italy. *Veterinary Microbiology*, 138, 361-367.



- National Institute for Biological Standards and Control (NIBCS). (2009). Influenza virus pandemic (H1N1) 2009. Retrieved from [http://www.nibsc.ac.uk/flu\\_site/swineflu.html](http://www.nibsc.ac.uk/flu_site/swineflu.html)
- Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J, Ghedin E, *et al.* (2009). The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Curr*, 3(1).
- Nelson MI, Lemey P, Tan Y, Vincent A, Lam TT. (2011). Spatial Dynamics of Human-Origin H1 Influenza A Virus in North American Swine. *PLoS Pathogens*, 7(6).
- Neumann G, Noda T, Kawakami Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine origin H1N1 influenza virus. *Nature* (459), 931-939.
- Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. (2000). Influenza B virus in seals. *Science*, 288, 1051-1053.
- Palese P, Shaw M. (2006). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In H. P. Knipe D (Ed.), *Fields Virology* (Fifth ed., Vol. II, pp. 1647-1689). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. (1981). Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Organ* (59), 75-78.
- Rabadan R, Robins H. (2007). Evolution of the influenza A virus: some new advances. *Evol Bioinform Online* (3), 299-307.
- Reid AH, Taubenberger JK. (2003). The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol* (84), 2285-2292.
- Renegar KB, Small PA Jr. (1991). Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti influenza virus immunity. *J Virol* (65), 2146-2148.
- Rogers GN, D Souza BL. (1989). Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* 1739 317-322.
- Rogers GN, Paulson JC. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* (2), 361-373.

- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, *et al.* (2006). The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities of drug design. *Nature* (45).
- Salomon R, Webster RG. (2009). The influenza virus enigma. *Cel* (136), 402-410.
- Scholtissek C, Burger H, Kistner O, Shortridge KF. (1985). The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*, 147, 287-294.
- Schwarz G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Ann Stat*, 6, 461-464.
- Sheerar MG, Easterday BC, Hinshaw VS. (1989). Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses. *J Gen Virol* (70), 3297-3303.
- Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, *et al.* (2009). Triple reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med*, 360(25), 2616-2625.
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440, 435-436.
- Shope RE. (1931). Swine Influenza III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med* (54), 373-385.
- Skehel JJ, Wiley DC. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69, 531-569.
- Smith GJ, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LL, Chen H. (2009). Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 11709-11712.
- Steinhauer DA, Skehel JJ. (2002). Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet*, 305-332.
- Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. (2006). Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 312, 404-410.

- Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Pales P, Wilson IA. (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science*, 303, 1866-1870.
- Strauss J, Strauss E. (2008). Minus strand RNA Viruses. In: *Viruses and human disease* (2nd ed., Vol. 4). Oxford: UK:Elsevier.
- Suzuki Y. (2006). Natural selection on the influenza virus genome. *Mol Biol Evol*, 23, 1902-1911.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. 28, 2731-2739.
- Tanimoto T, Nakatsu R, Fuke I, *et al.* (2005). Estimation of the neuraminidase content of influenza viruses and split product vaccines by immunochromatography. *Vaccine*, 23 (37), 4598-4609.
- Tatusov, Tatusova. (1988). National Center for Biotechnology Information. Retrieved April 2012, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>
- Thifonov V, Khiabani H, Rabadan R. (2009). Geographic dependence surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med* (361), 115-119.
- Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. (2006). Cell mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis*, 12, 48-54.
- Torremorell M, Allerson M, Corzo C, Diaz A, Gramer M. (2011). Transmission of Influenza A Virus in Pigs. *Transbound Emerg Dis*, 59, 68-84.
- Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, *et al.* (2004). Avian A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 12, 1179-1188.
- Treanor J. (2004). Influenza vaccine outmaneuvering antigenic shift and drift. *N Engl J Med* 350, 218-220.
- Tu J, Z. H. (2009). Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol*, 154, 887-890.

- Tumpey TM, Garcia Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Basler CF. (2004). Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. (101) 3166-3171.
- Vincent AL, *et al.* (2006). Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol* (118), 212-222.
- Vincent AL, *et al.* (2009). Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. *Vet Microbiol* (137), 51-59.
- Webby RJ, *et al.* (2000). Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* (74), 8243-8251.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y, *et al.* (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 56, 152-179.
- Widjaja L, Ilyushina N, Webster R, Webby R. (2006). Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs. *Virology*, 350, 137-145.
- World Health Organization. (2009). Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir 2008/2009 influenza season, northern hemisphere. Retrieved 08 16, 2009, from [http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1\\_tableÇ/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1_tableÇ/en/index.html)
- Wright P, Neumann G, Kawaoka Y. (2006). Orthomyxoviruses. In: Knipe D, Howley P, editors, translator and editor. *Fields Virology*. (Fifth edition. ed., Vol. II). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Yu H, (2008). Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China. *Vet Microbiol*, 131, 82-92.
- Zhou B, Donnelly M, Scholes D, *et al.*, (2009). Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J Virol* 83, 10309-10313.

- Zhou NN, *et al.*, (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol* 73, 8851-8856.

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1. Nomenclatura y tipo de muestras clínicas, resultados mediante diferentes técnicas moleculares.**

No.	Nomenclatura	Tipo de Muestra	One Step RT-PCR				RT-PCR Multi-segmento	Secuenciación Parcial			
			H1	N1	H3	N2		H1	N1	H3	N2
1	A/Cerdo/Veracruz/0/09	PULMÓN	-	+	-	-	-	-	√	-	-
2	A/Cerdo/Estado de México/1/09	PULMÓN	-	+	-	-	-	-	√	-	-
3	A/Cerdo/Estado de México/2/09	PULMÓN	-	+	-	-	-	-	√	-	-
4	A/Cerdo/Tamaulipas/3/09	PULMÓN	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	A/Cerdo/Veracruz/7/09	PULMÓN	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	A/Cerdo/Estado de México/19/09	PULMÓN	-	+	-	-	+	-	√	-	-
7	A/Cerdo/Oaxaca/20/09	PULMÓN	-	+	-	-	-	-	√	-	-
8	A/Cerdo/Estado de México/23/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	A/Cerdo/Jalisco/26/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	A/Cerdo/Jalisco/27/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	A/Cerdo/Veracruz/29/09	PULMÓN	-	-	-	-	+	-	-	-	-
12	A/Cerdo/Veracruz/31/09	PULMÓN	-	+	-	-	+	-	√	-	-
13	A/Cerdo/Querétaro/32/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	A/Cerdo/Querétaro/35/09	PULMÓN	-	-	-	-	+	-	-	-	-
15	A/Cerdo/Guanajuato/36/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	A/Cerdo/Veracruz/37/09	PULMÓN	-	-	-	-	+	-	-	-	-
17	A/Cerdo/Michoacán/40/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	A/Cerdo/Hidalgo/46/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	A/Cerdo/Estado de México/47/09	PULMÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	A/Cerdo/Estado de México/48/09	SEMEN	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21	A/Cerdo/Estado de México/49/09	SEMEN	-	+	-	-	-	-	√	-	-
22	A/Cerdo/Estado de México/50/09	A. VIRAL	-	+	-	+	-	-	√	-	-
23	A/Cerdo/Estado de México/51/09	A. VIRAL	-	+	-	+	+	-	-	-	-
24	A/Cerdo/Estado de México/52/09	A. VIRAL	-	+	-	-	+	-	-	-	-
25	A/Cerdo/Sonora/67/10	SUERO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	A/Cerdo/Guerrero/68/10	PULMON	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	A/Cerdo/Distrito Federal/69/10	PULMON	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	A/Cerdo/Tlaxcala/70/10	PULMON	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	A/Cerdo/Puebla/71/10	PULMON	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	A/Cerdo/Hidalgo/74/11	PULMON	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	A/Cerdo/Morelos/75/11	SEMEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	A/Cerdo/DMZC/11/H1N1	A. VIRAL	-	+	-	-	+	-	√	-	-
33	A/Cerdo/DMZC/11/H3N2	A. VIRAL	-	-	+	+	+	-	-	√	√

**+ Muestra positiva**

**- Muestra negativa**

**√ Electroferograma obtenido**

**Cuadro 2. Secuencias pandémicas periodo 2009-2012 identificadas en cerdos y humanos en México, incluidas en el análisis bioinformático.**

<b>Nomenclatura</b>	<b>HA en nct</b>	<b>NA en nct</b>	<b>HA en aa</b>	<b>NA en aa</b>
A/Humano/California/2009 (H1N1)	*N/A	FJ966084	*N/A	ACP41107
A/Humano/MéxicoLaGloria/2009 (H1N1)	*N/A	CY077597	*N/A	ADT64478
A/Humano/MéxicoCity/2009 (H1N1)	*N/A	CY050200	*N/A	ACY77947
A/Cerdo/Querétaro/2009 (H1N1)	*N/A	ADA72003	*N/A	ADA72005
A/Humano/MéxicoInDRE/2010	*N/A	CY057074	*N/A	ADD84685
A/Humano/MéxicoInDRE/2011 (H1N1),	*N/A	CY089388	*N/A	AEA74032
A/Humano/MéxicoInDRE/2012 (H1N1)	*N/A	CY110744	*N/A	AFB18655
A/Humano/Indiana/2011 (H3N2)	JN638733	AEO00689	JN638732	AEO00688
A/Humano/Pennsylvania/2011 (H3N2)	JN65537	AEO16287	JN655533	AEO16282
A/Cerdo/Iowa/2011 (H3N2)	JQ350522	JQ350524	AEY75650	AEY75652
A/Cerdo/Minnesota/2011 (H3N2)	JQ783072	AFH53671	JQ783097	AFH53696

\*N/A No aplica

**Cuadro 3. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011 en nucleótidos, tamaño de la secuencia obtenida de 701 pb.**

No. de Acceso GenBank	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
CY035072	Cerdo	1990	Memphis	100	95	H1N1
CY028782	Cerdo	1991	California	100	95	H1N1
CY022335	Cerdo	1988	Iowa	100	95	H1N1
CY039927	Cerdo	1988	Indiana	100	94	H1N1
EU735788	Pavo	1988	*N/R	100	94	H1N1
CY039919	Cerdo	1988	Wisconsin	100	94	H1N1
EU139837	Cerdo	1999	Minnesota	100	94	H1N1
CY040572	Cerdo	2003	North Carolina	100	94	H1N1
EU139839	Cerdo	2002	North Carolina	100	94	H1N1
EU409956	Cerdo	2004	Ohio	100	94	H1N1
EU743161	Pavo	1992	*N/R	100	93	H1N1
CY087066	Cerdo	1994	Hong Kong	100	93	H1N1
CY040544	Cerdo	2004	North Carolina	100	93	H1N1
CY040540	Cerdo	2005	North Carolina	100	93	H1N1
CY099193	Cerdo	2003	Illinois	100	93	H1N1
CY028189	Cerdo	1976	Wisconsin	100	93	H1N1
CY022351	Cerdo	1976	Kentucky	100	93	H1N1
CY099161	Cerdo	2008	Ohio	100	93	H1N1
CY099097	Cerdo	2008	Illinois	100	93	H1N1
HQ378742	Cerdo	2009	Missouri	100	93	H1N1

\*N/R No Reportado



**Cuadro 4. Análisis BLAST secuencias N1 en nucleótidos de muestras clínicas: A/Cerdo/Veracruz/0/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/1/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/2/09/N1, A/Cerdo/Oaxaca/20/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/49/09/N1, A/Cerdo/Veracruz/31/09/N1**

No. de Acceso Gen Bank	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
AF342820	Cerdo	1998	Wisconsin	99	98	H1N1
CY035072	Cerdo	1990	Memphis	100	97	H1N1
CY028782	Cerdo	1991	California	100	97	H1N1
CY022335	Cerdo	1988	Iowa	100	97	H1N1
EU735788	Pavo	1988	NC	100	97	H1N1
EU139837	Cerdo	1999	Minnesota	100	96	H1N1
CY040580	Cerdo	2003	North Carolina	100	96	H1N1
EU743161	Pavo	1992	*N/R	100	96	H1N1
CY040544	Cerdo	2004	North Carolina	100	96	H1N1
EU409956	Cerdo	2004	Ohio	99	96	H1N1
CY085019	Cerdo	1993	Hong Kong	100	95	H1N1
CY099097	Cerdo	2008	Illinois	100	95	H1N1
CY099019	Cerdo	2003	Kentucky	100	95	H1N1
CY022980	Cerdo	1981	Ontario	100	95	H1N1
CY099161	Cerdo	2008	Ohio	100	95	H1N1
CY099089	Cerdo	2005	Nebraska	100	95	H1N1
EU735796	Gallina	1991	USA	99	95	H1N1
DQ150427	Cerdo	*N/R	USA	99	95	H3N1

\*N/R No Reportado

**Cuadro 5. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011/H3 secuencias en nucleótidos, tamaño de la secuencia obtenida de 666 pb.**

No. de Acceso	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
CY041879	Pato	2007	South Dakota	100	98	H3N2
AF251427	Cerdo	1999	Minnesota	100	98	H3N2
AF251403	Cerdo	1998	Nebraska	100	98	H3N2
CY095675	Cerdo	1998	Texas	100	98	H3N2
AF153234	Cerdo	1998	Minnesota	100	98	H3N2
HM765432	Cerdo	2007	China	99	97	H3N2
EU798792	Cerdo	2006	Korea	99	97	H3N2
AY661196	*N/R	1995	Finlandia	100	96	H3N2
AY661187	*N/R	1995	Hong Kong	100	96	H3N2
AB019354	*N/R	1995	Japón	100	96	H3N2
CY013319	Humano	1995	New York	100	96	H3N2
AY661194	*N/R	1996	Holanda	100	96	H3N2
AY661182	*N/R	1995	Génova	100	96	H3N2
AF534018	*N/R	1995	Argentina	100	96	H3N2
AF017271	C/Vero	1996	Viena	100	96	H3N2
AY661192	*N/R	1995	Lyon	100	96	H3N2
CY038503	Humano	1995	Siena	100	96	H3N2
CY077800	Humano	1993	Holanda	100	96	H3N2
CY017307	Humano	1994	New York	100	96	H3N2

\*N/R No Reportado

**Cuadro 6. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011/N2 secuencias en nucleótidos, tamaño de la secuencia obtenida de 382 pb.**

No. de Acceso al Gen Bank	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
CY095677	Cerdo	1998	Texas	100	99	H3N2
CY041881	Pato	2007	South Dakota	100	99	H3N2
AF251428	Cerdo	1999	Minnesota	100	99	H3N2
AF251412	Cerdo	1999	Iowa	100	99	H3N2
AF153238	Cerdo	1998	Minnesota	100	99	H3N2
CY036849	Humano	1997	Siena	100	99	H3N2
EU857289	Humano	1997	Hong Kong	100	99	H3N2
AY038015	Pavo	1999	*N/R	100	99	H3N2
EF584366	Humano	1997	Atenas	100	98	H3N2
CY012202	Humano	1996	New York	100	98	H3N2
AY233391	Pato	2001	USA	100	98	H3N2
CY098470	Cerdo	2001	Minnesota	100	98	H1N2
CY086748	Cerdo	2004	Hong Kong	100	98	H1N2
HM765434	Cerdo	2007	China	100	98	H3N2
EU798836	Cerdo	2007	Korea	100	98	H3N2
EF584375	Humano	1997	Brasil	100	98	H3N2
EF584363	Humano	1997	Sydney	100	98	H3N2
AJ307600	Humano	2000	Montreal	100	98	H3N2
AY060093	Cerdo	2001	USA	98	99	H1N2
AY052779	Cerdo	2001	Minnesota	98	99	H1N2

\*N/R No Reportado

**Cuadro 7. Análisis BLAST del virus referencia A/cerdo/DMZC/2011/N1  
secuencias en aminoácidos 178 residuos.**

No. de Acceso Gen Bank	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
ABW75643	Cerdo	2005	Korea	98	96	H1N1
AAR90875	Cerdo	2001	Taiwan	98	94	H3N1
ABQ45417	Cerdo	1976	Tennessee	100	94	H1N1
AB549924	Cerdo	1977	Iowa	98	96	H1N1
ACR26680	Cerdo	2005	Minnesota	98	93	H1N1
ACI41025	Pavo	1988	USA	98	96	H1N1
ADY70082	Cerdo	1977	Hong Kong	98	96	H1N1
ABV25648	Cerdo	1999	Minnesota	98	96	H1N1
ABY84687	Cerdo	1991	California	98	96	H1N1
ACQ84500	Cerdo	1988	Indiana	98	96	H1N1
ADY71068	Cerdo	2001	Hong Kong	100	93	H1N1
ABS50114	Swine	1987	Iowa	98	95	H1N1
ACF25593	Pavo	1992	USA	98	96	H1N1
ADY70988	Cerdo	2001	Hong Kong	100	93	H1N1
ACD88519	Pavo	1980	Kansas	98	95	H1N1
ACF25034	Gallina	1998	USA	98	96	H1N1
ARR28661	Cerdo	1981	Ontario	98	95	H1N1
AEO91836	Cerdo	2003	Illinois	98	95	H1N1
ACR26718	Cerdo	2003	North Carolina	98	95	H1N1
ACN90189	Cerdo	2003	Taiwan	98	94	H3N1

\*N/R No Reportado

**Cuadro 8. Análisis BLAST secuencias en aminoácidos muestras clínicas:  
A/Cerdo/Veracruz/0/09/N1, A/Cerdo/EdoMex/1/09/N1,  
A/Cerdo/EdoMex/2/09/N1, A/Cerdo/Oaxaca/20/09/N1,  
A/Cerdo/EdoMex/49/09/N1, A/Cerdo/Veracruz/31/09/N1**

No. de Acceso Gen Bank	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
ABW75643	Cerdo	2005	Korea	100	99	H1N1
AAR90875	Cerdo	2001	Taiwan	100	98	H3N1
ACR26680	Cerdo	2005	Minnesota	100	96	H1N1
ABV29527	Cerdo	1977	Tennessee	100	99	H1N1
ADY70082	Cerdo	1977	Hong Kong	100	99	H1N1
ABV25648	Cerdo	1999	Minnesota	100	99	H1N1
ADY70918	Cerdo	2000	Hong Kong	100	98	H1N1
ABY84687	Cerdo	1991	California	100	99	H1N1
ACF25593	Pavo	1992	USA	100	99	H1N1
ACD88519	Pavo	1980	Kansas	100	98	H1N1
ABR28661	Cerdo	1981	Ontario	100	98	H1N1
ADY70948	Cerdo	2001	Hong Kong	100	98	H1N1
ABR28727	Cerdo	1970	Wisconsin	100	98	H1N1
BAG49744	Cerdo	1979	Kyoto	100	98	H1N1
ACR26718	Cerdo	2003	North Carolina	100	98	H1N1
Q76WJ1	Aves Cerdos Humanos	1976	New Jersey	100	97	Rec Name full
ABV82576	Cerdo	1957	Wisconsin	100	97	H1N1
B3EUQ9 (UniProt)	Aves Cerdos Humanos	1961	Wisconsin	100	97	Rec Name
AEO91694	Cerdo (mixed)	2005	Nebraska	100	98	H1 H3
ADM18069	Cerdo	2008	Missouri	100	98	H1N1

\*N/R No Reportado

**Cuadro 9. Análisis BLAST del virus A/cerdo/DMZC/2011/H3 secuencias en aminoácidos 220 residuos.**

No. de Acceso Gen Bank	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
AAD51242	Cerdo	1998	Iowa	99	98	*N/R
AAG10739	Cerdo	1999	North Carolina	99	97	H3N2
AAD51240	Cerdo	1999	Texas	99	97	H3N2
ACS92202	Pato	2007	South Dakota	99	98	H3N2
AAC80153	*N/R	1994	Japón	99	94	H3N2
AAT64870	*N/R	1996	Geneva	99	94	H3N2
AAT64862	*N/R	1995	Hong Kong	99	94	H3N2
AAT64814	*N/R	1993	Holanda	99	93	H3N2
AAT64858	*N/R	1995	Finlandia	99	93	H3N2
ADK89127	Cerdo	2007	China	99	95	H3N2
AAT64826	*N/R	1993	Madrid	99	93	H3N2
AAF06949	MDCK	1996	Lyon	99 R. Precursora	93	H3N2
BAA21648	*N/R	1993	China	99 R. Precursora	93	H3N2
AAT64873	*N/R	1996	Singapore	99	93	H3N2
AAC59603	*N/R	1996	Vienna	99	93	H3N2
BAA96303	*N/R	1994	Japon	100	91	H3N2
ABG26253	*N/R	1998	Marruecos	99	92	H3N2
AAQ10356	*N/R	1995	Buenos Aires	99	93	H3N2
AAT64849	*N/R	1993	Noruega	99	92	H3N2
AEA51525	Humano	1997	Escocia	97	94	H3N2

\*N/R No Reportado

**Cuadro 10. Análisis BLAST del virus A/cerdo/DMZC/2011/N2 secuencias en aminoácidos 119 residuos.**

No. de Acceso Gen Bank	Huésped	Año	Región Geográfica	% Similitud Total	% Similitud Parcial	Subtipo
AAL15460	Cerdo	2000	Minnesota	98	98	H1N2
AAL29742	Cerdo	1999	*N/R	98	98	H1N2
AAL29757	Cerdo	2000	*N/R	98	97	H1N2
ADY72553	Cerdo	2005	Hong Kong	100	97	H1N2
AAL29761	Cerdo	2001	*N/R	98	96	H1N2
AAG49332	Humano	1998	Atenas	100	98	H3N2
ACK99479	Humano	1997	Siena	100	98	H3N2
AAG10751	Cerdo	1999	North Carolina	100	98	H3N2
ACE78000	Cerdo	2005	Korea	100	98	H3N2
AAG01759	Cerdo	1998	Nebraska	100	98	H3N2
ACS92904	Pato	2007	South Dakota	100	98	H3N2
AAK71688	Pavo	1999	USA	100	98	H1N2
AAO65610	Pato	2001	USA	100	98	H1N2
ADY72039	Cerdo	1999	Hong Kong	100	94	H1N2
ACE78002	Cerdo	2007	Korea	100	97	H3N2
ADY72433	Cerdo	2003	Hong Kong	100	94	H1N2
ADY72465	Cerdo	2004	Hong Kong	100	94	H1N2
ABV25649	Cerdo	2001	Minnesota	100	97	H1N2
ABE12650	Humano	1996	New York	100	97	H3N2
ADY72643	Cerdo	2008	Hong Kong	100	95	H1N2
ACV42119	Cerdo	2008	Texas	100	95	H1N2

\*N/R No Reportado

**Cuadro 11. SNPs identificados en el segmento N1 secuencias en nucleótidos.**

Virus	POSICIÓN DE VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA																												
	438	450	465	468	480	486	489	549	618	630	660	670	687	696	702	711	732	750	756	763	794	795	799	808	825	865	870	939	945
1 A/Cerdo/NewJersey/1976(N1)	T	G	T	A	C	C	C	A	A	T	A	T	T	T	A	G	C	A	G	T	G	G	A	G	C	G	T	A	G
2 A/Cerdo/DMZC/11/N1	C	A	C	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
3 A/Cerdo/Veracruz/0/09(N1)	.	.	.	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
4 A/Cerdo/EdoMex/1/09(N1)	.	.	.	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
5 A/Cerdo/EdoMex/2/09(N1)	.	.	.	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
6 A/Cerdo/Oaxaca/20/09(N1)	.	.	.	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
7 A/Cerdo/EdoMex/49/09(N1)	.	.	.	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
8 A/Cerdo/Veracruz/31/09(N1)	.	.	.	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
9 A/Cerdo/EdoMex/19/09(N1)	C	A	C	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	T	G	A
10 A/Cerdo/EdoMex/50/09(N1)	C	A	C	G	T	G	T	T	G	G	G	C	A	C	C	A	T	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	G	A
11 A/Humano/California/2009(H1N1)	T	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A	G	A	C	A	T	G	A
12 A/Humano/México City/2009(H1N1)	T	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A	G	A	C	A	T	G	A
13 A/Humano/MéxicoInDRE/2012(H1N1)	T	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	T	T	A	A	T	T	A	A	A	A	A	G	A	C	A	T	G	A
14 A/Humano/MéxicoInDRE/2011(H1N1)	T	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A	G	A	C	A	T	G	A
15 A/Humano/MéxicoInDRE/2010(H1N1)	T	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A	G	A	C	A	T	G	A
16 A/Humano/MéxicoLaGloria/2009(H1N1)	T	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A	G	A	C	A	T	G	A
17 A/Cerdo/Querétaro/2009(H1N1)	T	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	T	T	A	A	T	T	G	A	A	A	A	G	A	C	A	T	G	A



**Cuadro 12. Cambios evolutivos identificados en el segmento N1 secuencias en aminoácidos.**

Virus	Número de residuo																														
	188	191	210	212	222	232	234	241	248	254	255	257	258	259	262	264	265	267	269	270	275	285	286	287	288	289	298	307	308	311	
1 A/Cerdo/NewJersey/1976/H1N1	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	L	K	M	E	K	I	R	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
2 A/Cerdo/DMZC/2011/N1	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
3 A/Cerdo/Veracruz/0/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
4 A/Cerdo/EdoMex/1/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
5 A/Cerdo/EdoMex/2/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
6 A/Cerdo/EdoMex/19/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
7 A/Cerdo/Oaxaca/20/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
8 A/Cerdo/Veracruz/31/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
9 A/Cerdo/EdoMex/49/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
10 A/Cerdo/EdoMex/50/09	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
11 NRAM 176A7/RecName: Full Neuraminidasa	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	L	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
12 NRAM 161A1/RecName: Full Neuraminidasa	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	R	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
13 A/Cerdo/Korea/2005(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
14 A/Cerdo/Taiwan/2001(H3N1)	T	L	D	V	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	V	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
15 A/Cerdo/Iowa/1977(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
16 A/Cerdo/Minnesota/2005(H1N1)	M	L	G	I	K	V	M	V	N	K	I	K	M	E	K	I	K	I	L	D	H	A	G	K	V	M	A	D	Q	D	
17 A/Pavo/NC/1988(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
18 A/Cerdo/HongKong/1977(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	I	L	N	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
19 A/Cerdo/Minnesota/1999(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	M	A	D	R	D	
20 A/Cerdo/California/1991(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
21 A/Cerdo/Indiana/1988(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
22 A/Cerdo/Iowa/1987(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
23 A/Pavo/USA/1992(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
24 A/Pavo/Kansas/1980(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
25 A/Pollo/NY/1998(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	E	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
26 A/Cerdo/Ontario/1981(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
27 A/Cerdo/Illinois/2003(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	K	K	I	K	V	M	N	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	N	
28 A/Cerdo/NorthCarolina/2003(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	N	
29 A/Cerdo/Taiwan/2003(H3N1)	T	L	D	V	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	V	K	V	L	N	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
30 A/Cerdo/Tennessee/1977(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
31 A/Cerdo/HongKong/2000(H1N1)	M	I	G	I	K	V	I	I	N	R	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	M	A	D	Q	D	
32 A/Cerdo/HongKong/2001(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
33 A/Cerdo/Wisconsin/1970(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	R	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
34 A/Cerdo/Kyoto/1979(H1N1)	M	L	G	I	K	V	M	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
35 A/Cerdo/Wisconsin/1957(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	R	I	K	I	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	D	
36 A/Cerdo/Nebraska/2005(mixed)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	N	
37 A/Cerdo/Missouri/2008(H1N1)	M	L	G	I	K	V	I	I	N	K	I	K	M	E	K	I	K	V	L	D	H	T	G	K	V	V	A	D	Q	N	
38 A/Humano/California/2009	I	L	G	I	N	A	V	V	N	K	I	R	I	E	K	V	K	V	M	N	H	S	S	E	V	T	G	N	Q	E	
39 A/Humano/México City/2009	I	L	G	I	N	A	V	V	D	K	I	R	I	E	K	V	K	V	M	N	H	S	S	E	I	T	G	N	Q	E	
40 A/Humano/México/InDRE/2012	I	L	G	I	N	A	V	I	D	K	I	R	I	E	K	V	K	V	M	N	Y	S	S	E	I	T	G	N	Q	E	
41 A/Humano/México/InDRE/2011	I	L	G	I	N	A	V	V	D	K	I	R	I	E	K	V	K	V	M	N	H	S	S	E	I	T	G	N	Q	E	
42 A/Humano/México/InDRE/2010	I	L	G	I	N	A	V	V	D	K	I	R	I	E	K	V	K	V	M	N	Y	S	S	E	I	T	G	N	Q	E	
43 A/Humano/MéxicoLaGloria2009	I	L	G	I	N	A	V	V	N	K	I	R	I	E	K	V	K	V	M	N	H	S	S	E	I	T	G	N	Q	E	
44 A/Cerdo/México/2009(H1N1)	I	L	G	I	N	A	V	V	N	K	I	R	I	E	K	V	K	V	M	N	H	S	S	E	I	T	G	N	Q	E	

**Cuadro 13. SNPs identificados en el segmento H3 secuencias en nucleótidos.**

	Virus	POSICIÓN DE VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA									
		112	245	265	308	486	502	539	551	659	703
1	A/Cerdo/Minnesota/98/(H3N2)	C	A	A	C	T	G	A	G	G	A
2	A/DMZC-UNAM/2011/H3	T	C	G	T	A	A	G	A	A	G
3	A/Cerdo/Iowa/2011 (H3N2)	C	C	A	T	T	G	G	T	A	G
4	A/Cerdo/Minnesota/2011 (H3N2)	C	C	A	T	T	A	G	T	A	G
5	A/Humano/Indiana/2011 (H3N2)	C	C	A	T	T	G	G	T	A	G
6	A/Humano/Pennsylvania/2011 (H3N2)	C	C	A	T	T	G	G	T	A	G

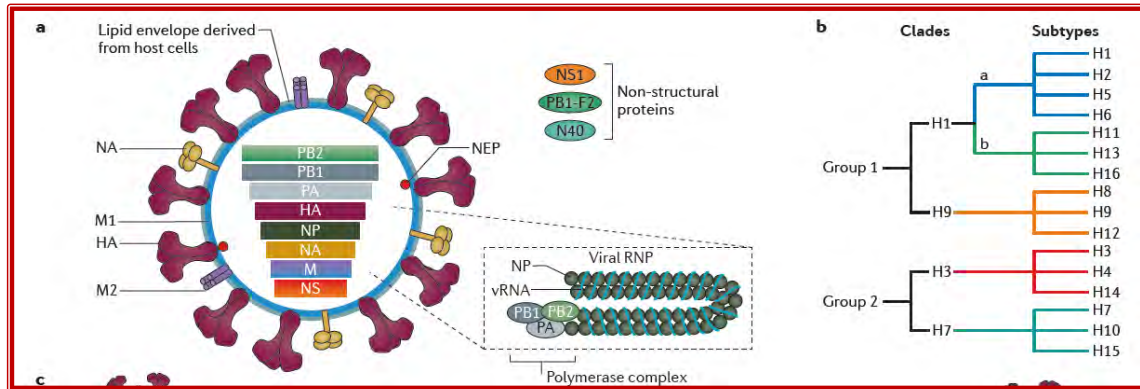
**Cuadro 14. Cambios evolutivos identificados en el segmento H3 secuencias en aminoácidos.**

Virus	Número de Residuo																																																								
	14	19	22	26	28	37	47	66	69	72	73	79	91	94	95	98	104	108	114	117	122	123	133	137	138	140	149	151	153	154	156	158	160	161	171	172	173	174	175	177	179	180	188	202	205	206	208	209	212	213	215	219	223	223	225	230	
1 A/Cerdo/Minnesota/98(H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	Q	R	N	H	G	F	K	I	K	Y	D	S	S	T	T	N	D	D	G	Y	S	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	E	T	S	V	Q	I	T	K	S	N	I	
2 A/Cerdo/DMZC/2011 H3	V	L	N	T	M	P	N	R	D	H	R	S	H	G	F	K	I	K	Y	D	S	S	T	T	N	D	D	G	N	S	K	E	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	E	T	S	V	Q	I	T	K	S	S	N	
3 A/Cerdo/Iowa/1998	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	I	K	Y	D	S	S	T	T	N	D	D	G	H	S	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	E	T	S	V	Q	I	T	K	S	S	I	
4 A/Cerdo/NorthCarolina/1999 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	I	K	Y	D	S	S	T	T	N	D	D	G	H	S	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	E	T	S	V	Q	I	T	K	S	S	I	
5 A/Cerdo/Texas/1998 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	I	K	Y	D	S	S	T	T	N	D	D	G	Y	S	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	E	T	S	V	Q	I	T	K	S	S	I	
6 A/Pato/SouthDakota/2007 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	I	K	Y	D	S	S	T	T	N	D	D	G	N	S	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	E	T	S	V	Q	I	T	K	S	S	I	
7 precursor/HA1/region [Influenza A virus H3]	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	G	D	K	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
8 A/Geneva/1996/ (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	G	D	T	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
9 A/HongKong/1995 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	G	D	K	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
10 A/Netherlands/1993 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	I	N	D	D	G	Y	A	K	G	V	N	H	K	L	E	Y	Y	A	L	G	S	S	D	T	S	V	R	S	T	K	R	S	S	I
11 A/Finland/1995 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	K	G	D	E	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
12 A/Cerdo/China/2007 (H3N2)	V	L	N	T	M	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	D	D	G	Y	S	K	G	V	K	H	K	S	E	N	H	A	L	D	S	N	E	T	S	G	Q	I	T	K	S	S	I	
13 A/Madrid/1993 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	I	N	D	D	K	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	G	S	S	D	T	S	V	R	S	T	K	K	S	S	I
14 A/MDKC/Lyon/1996 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	G	D	T	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	I	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
15 A/Hebei/1993 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	I	N	D	D	G	Y	A	K	G	V	N	H	K	L	E	Y	Y	A	L	G	S	S	V	T	S	V	R	S	T	K	R	S	S	I
16 A/Singapore/1996 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	I	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	G	D	T	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	R	R	S	S	I
17 A/Vienna/1996 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	N	D	A	S	T	T	N	G	D	K	Y	A	K	G	V	N	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
18 A/Aichi/1994 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	I	N	D	D	K	Y	A	R	G	V	N	H	K	L	E	Y	Y	A	L	G	S	S	D	T	S	V	R	S	T	K	R	S	S	I
19 A/Rabat/1998 (H3N2)	V	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	N	N	S	N	T	Y	A	K	R	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	A	Q	S	T	K	R	S	S	I
20 A/BuenosAires/1995 (H3N2)	V	L	N	T	T	Q	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	G	D	K	Y	A	K	G	V	N	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
21 A/Oslo/1993 (H3N2)	V	I	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	N	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	I	N	D	D	E	Y	S	K	G	V	N	H	K	L	E	Y	Y	A	L	G	S	S	D	T	S	V	R	S	T	K	R	S	S	I
22 A/Humano/Scotland/1997 (H3N2)	-	L	N	T	T	P	N	R	D	H	R	N	H	G	F	K	V	K	Y	D	A	S	T	T	N	G	D	T	Y	A	K	G	V	K	H	K	L	E	Y	Y	A	L	D	S	S	D	T	S	V	Q	S	T	K	R	S	S	I
23 A/Cerdo/Iowa/2011 (H3N2)	I	L	S	M	T	P	D	R	N	H	Q	N	H	D	L	K	V	T	Y	Y	A	T	N	T	Q	S	D	S	Y	A	R	G	V	N	Y	N	L	N	Y	Y	E	Q	D	G	K	D	T	N	V	Q	S	I	K	R	S	S	I
24 A/Cerdo/Minnesota/2011 (H3N2)	I	L	S	M	T	P	D	R	S	H	Q	N	H	D	F	R	V	T	Y	Y	A	S	T	T	Q	S	D	S	Y	A	R	E	D	K	Y	H	L	N	Y	Y	A	L	D	G	K	D	T	N	V	Q	P	T	K	R	S	S	I
25 A/Humano/Indiana/2011 (H3N2)	I	L	S	M	T	P	D	G	N	H	Q	N	H	D	F	K	V	T	Y	Y	A	T	N	T	Q	S	G	S	Y	A	R	G	V	N	Y	N	L	N	Y	Y	E	Q	D	G	K	D	T	N	V	Q	S	I	K	R	S	S	I
26 A/Humano/Pennsylvania/2011 (H3N2)	I	L	S	M	T	P	D	G	N	H	Q	N	H	D	F	K	V	T	Y	Y	A	T	N	T	Q	S	G	S	Y	A	R	G	V	N	Y	N	L	N	Y	Y	E	Q	D	G	K	D	T	N	V	Q	S	I	K	R	S	S	I

**Cuadro 15. Cambios evolutivos identificados en el segmento N2 secuencias en aminoácidos.**

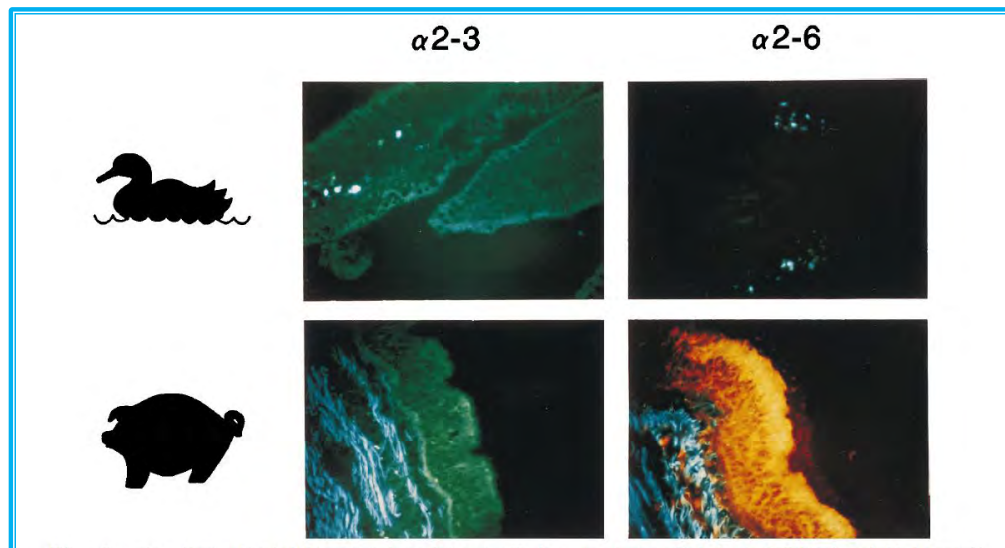
	Virus	Número de Residuo																
		170	174	192	195	197	203	206	219	233	247	255	256	261	263	265	267	282
1	A/Cerdo/Minnesota/98(H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
2	A/Cerdo/DMZC/2011 N2	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
3	A/Cerdo/Minnesota/2000 (H1N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
4	A/Cerdo/1999 (H1N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
5	A/Cerdo/Ohio/2000 (H1N2)	K	I	V	H	K	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
6	A/Cerdo/HongKong/2005 (H1N2)	K	I	V	H	E	L	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
7	A/Cerdo/2001 (H1N2)	K	I	V	H	E	F	N	K	G	R	I	K	V	I	P	L	Y
8	A/Athens/1998 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
9	A/Cerdo/NorthCarolina/1999 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
10	A/Siena/1997 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
11	A/Cerdo/Korea/2005 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
12	A/Cerdo/Nebraska/1998 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
13	A/Pato/SouthDakota/2007 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
14	A/Pavo/1999 (H1N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
15	A/Pato/2001 (H1N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	E	V	I	P	L	Y
16	A/Cerdo/Korea/2007 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	K	I	E	V	I	P	L	Y
17	A/Cerdo/HongKong/1999 (H1N2)	K	I	V	H	K	F	D	N	G	R	V	E	V	I	P	S	Y
18	A/Cerdo/HongKong/2003 (H1N2)	K	I	V	H	K	F	D	N	G	R	V	E	V	I	P	S	Y
19	A/Cerdo/HongKong/2004 (H1N2)	K	I	V	H	K	F	D	N	G	R	V	E	V	I	P	S	Y
20	A/Cerdo/Minnesota/2001 (H1N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	K	V	I	P	L	Y
21	A/Humano/NewYork/1996 (H3N2)	K	I	V	H	E	F	D	K	G	R	I	K	V	I	P	L	Y
22	A/Cerdo/HongKong/2008 (H1N2)	K	I	V	H	E	I	N	K	E	R	I	E	V	I	P	L	Y
23	A/Cerdo/Texas/2008 (H1N2)	K	I	I	H	E	F	D	K	G	K	I	E	I	I	P	L	Y
24	A/Cerdo/Iowa/2011 (H3N2)	R	M	I	N	N	F	N	N	G	K	V	E	V	I	T	S	F
25	A/Cerdo/Minnesota/2011 (H3N2)	R	I	I	D	E	F	N	N	G	K	I	V	I	V	K	S	Y
26	A/Humano/Indiana/2011 (H3N2)	R	M	I	N	N	F	N	N	G	K	V	E	V	I	T	S	F
27	A/Humano/Pennsylvania/2011 (H3N2)	R	M	I	N	N	F	N	N	G	K	V	E	V	I	T	S	F

## LISTA DE FIGURAS



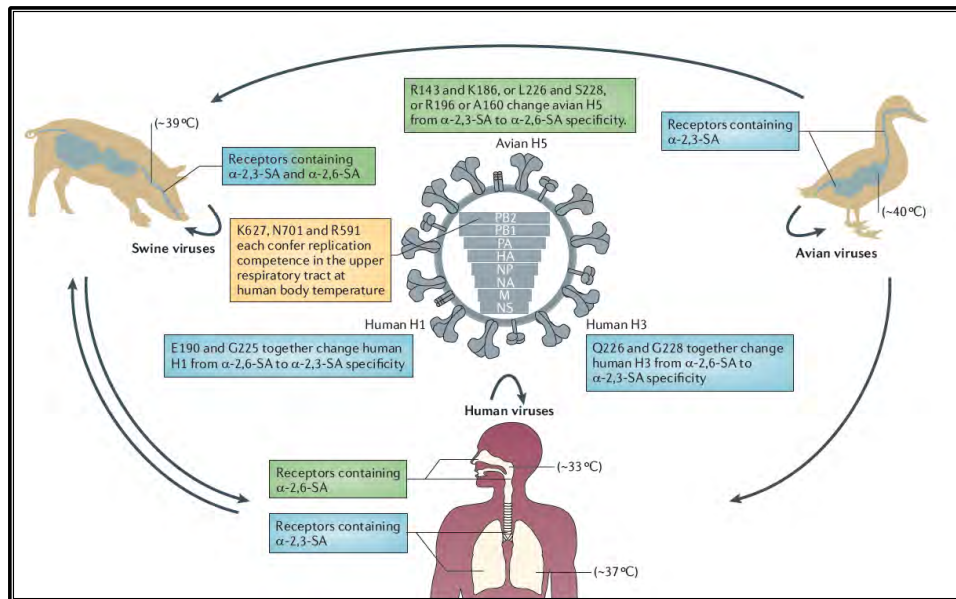
(Medina *et al.*, 2011)

**Figura 1.** a) Estructura viral del virus de influenza. b) Filogenética de la hemaglutinina. Las propiedades antigénicas de la hemaglutinina permiten la clasificación de los virus de la gripe A en dos grandes grupos, los cuales se clasifican en cinco clados y 16 subtipos.



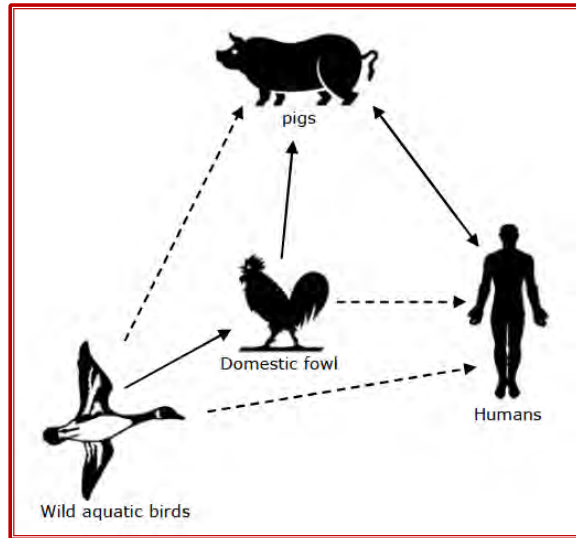
(Ito *et al.*, 1998)

**Figura 2.** Tinción de lectina para la identificación de receptores de ácido sialico en intestino de pato (colón)  $\alpha 2,3\text{Gal}$  y receptores en tráquea de cerdo  $\alpha 2,3\text{Gal}$  y  $\alpha 2,6\text{Gal}$ .



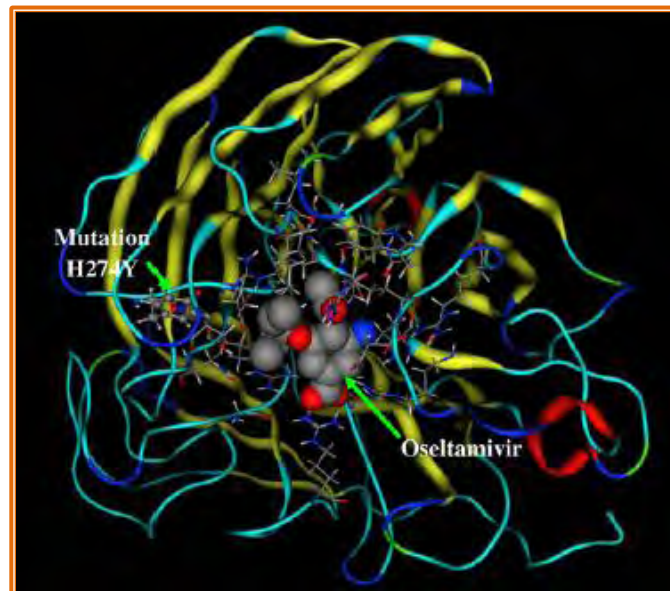
(Medina *et al.*, 2011)

**Figura 3. Afinidad de receptores virales en diferentes huéspedes.** Los virus aviáres se unen preferentemente a  $\alpha$ 2,3Gal, que se encuentra en el intestino y el tracto respiratorio de las aves. Los virus humanos estacionales H1N1, H3N2 y H1N1 pandémico 2009 tienen una mayor afinidad por  $\alpha$ 2,6Gal, que se expresan en el tracto respiratorio superior de los seres humanos.



(Ma et al., 2009)

**Figura 4. Transmisión interespecies**, las aves acuáticas silvestres son reservorios naturales de los 16 subtipos identificados de la hemaglutinina. Las líneas continuas indican transmisión de eventos frecuentes o confirmados, las líneas de puntos, posibles eventos ocasionales de transmisión.



(Du et al., 2010)

**Figura 5. Estructura 3D del complejo de la neuraminidasa del virus H1N1/2009 y posición de la Mutación His274Tyr que indica la resistencia al antiviral Oseltamivir (Tamiflu).**

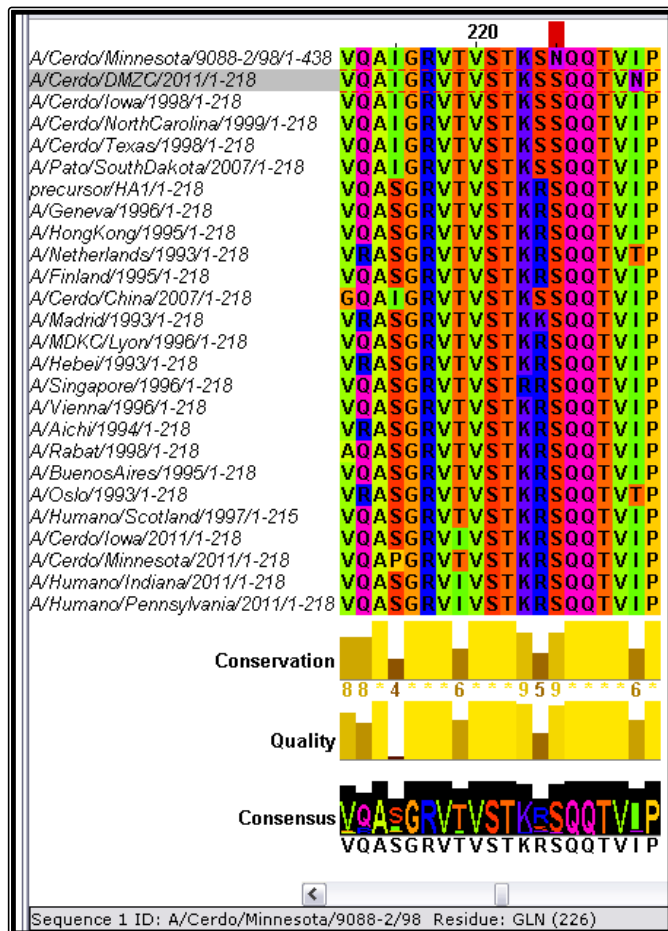


Figura 6. Alineación de secuencias del segmento H3 posición Gln226 (Q=Glutamina) y Thr 228 (T=Treonina).

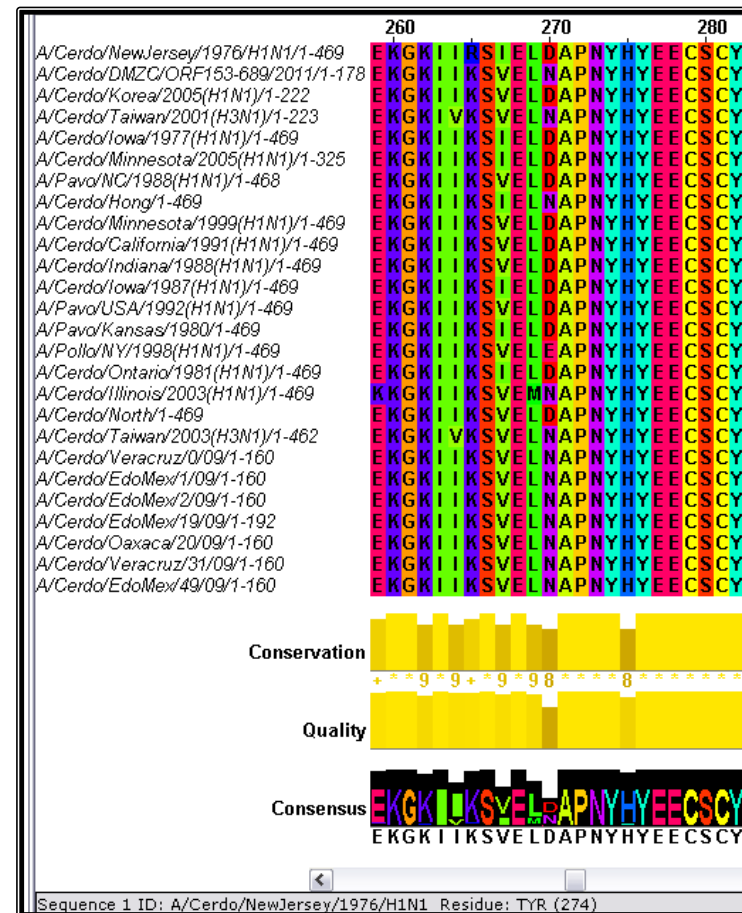


Figura 7. Alineación de secuencias del segmento N1 posición His274Tyr.

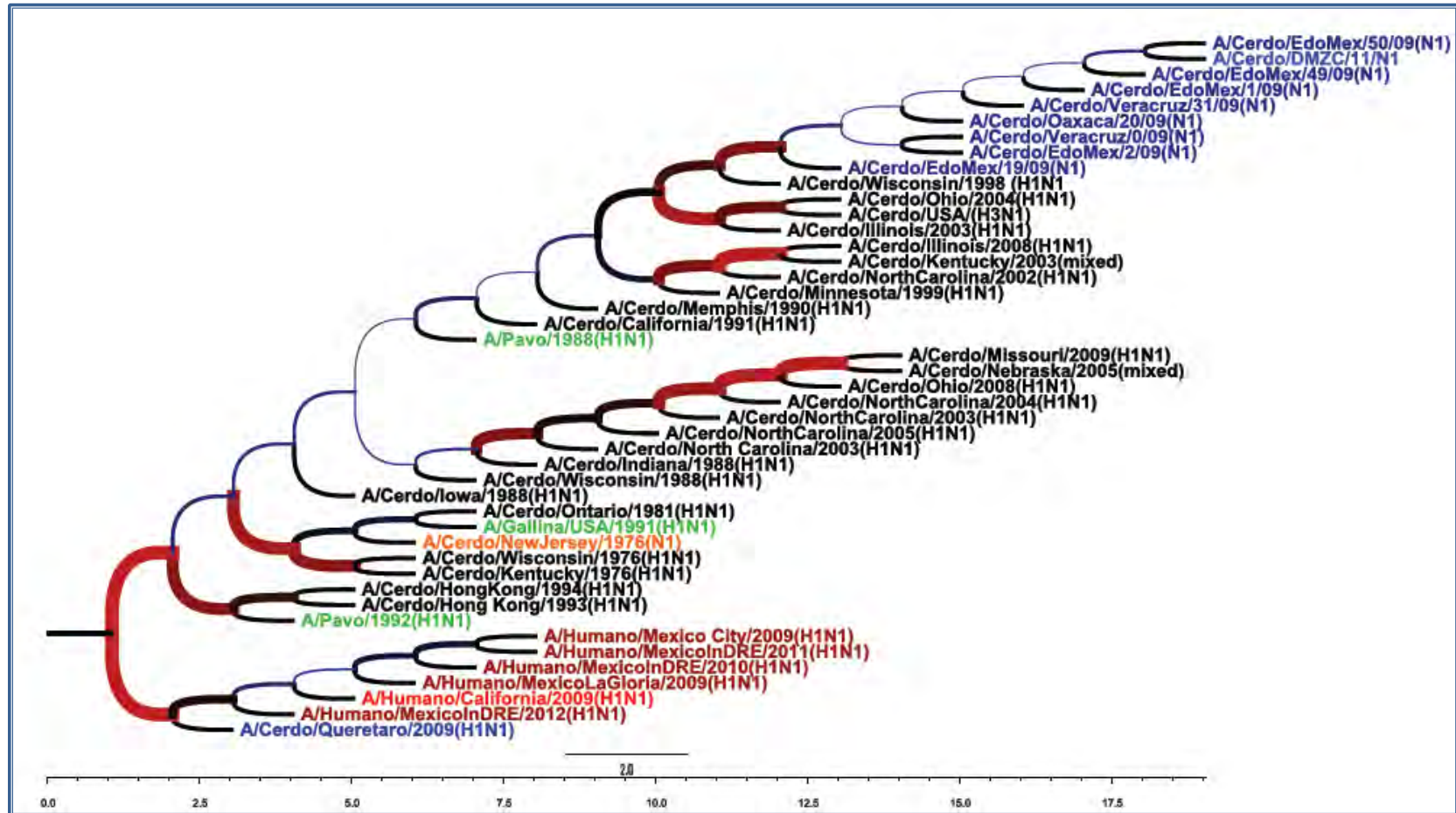
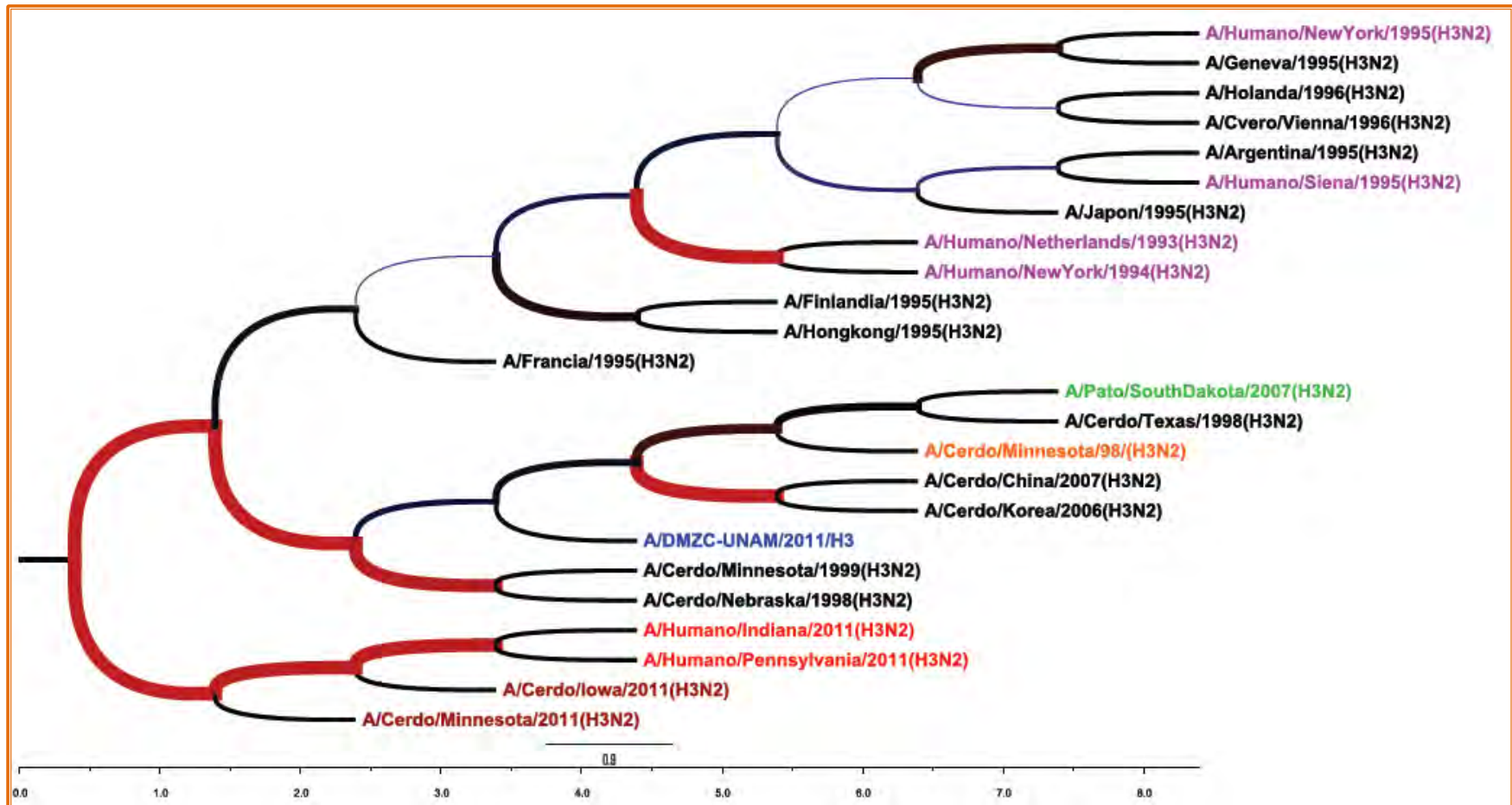


Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del segmento N1 a partir de muestras clínicas y virus referencia, se presentan secuencias en nucleótidos con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. El color de los taxones indica el huésped; negro=cerdo estacional, azul=cerdo periodo 2009-2011, verde=aviar, rojo=humano pandémico, naranja =virus referencia.





**Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento H3 a partir de secuencias en nucleótidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank.** El color de los taxones indica el huésped; negro=cerdo estacional, azul= cerdo periodo 2009-2011, verde=aviar, rojo=humano pandémico, naranja =virus referencia, morado=humano estacional.

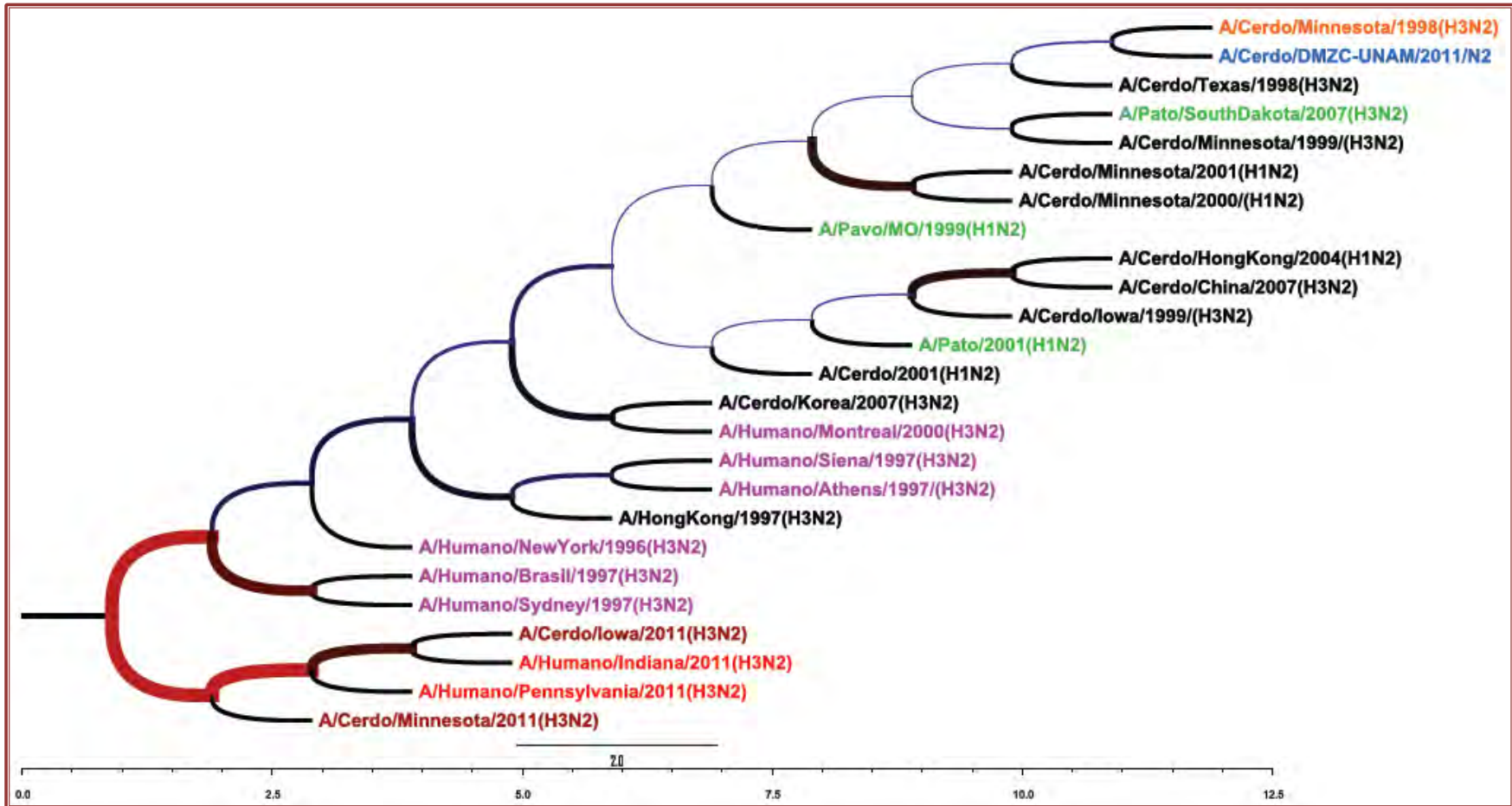


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento N2 a partir de secuencias en nucleótidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. El color de los taxones indica el huésped; negro=cerdo estacional, azul=cerdo referencia, verde=aviar, rojo=humano pandémico, naranja =virus referencia, morado=humano estacional.

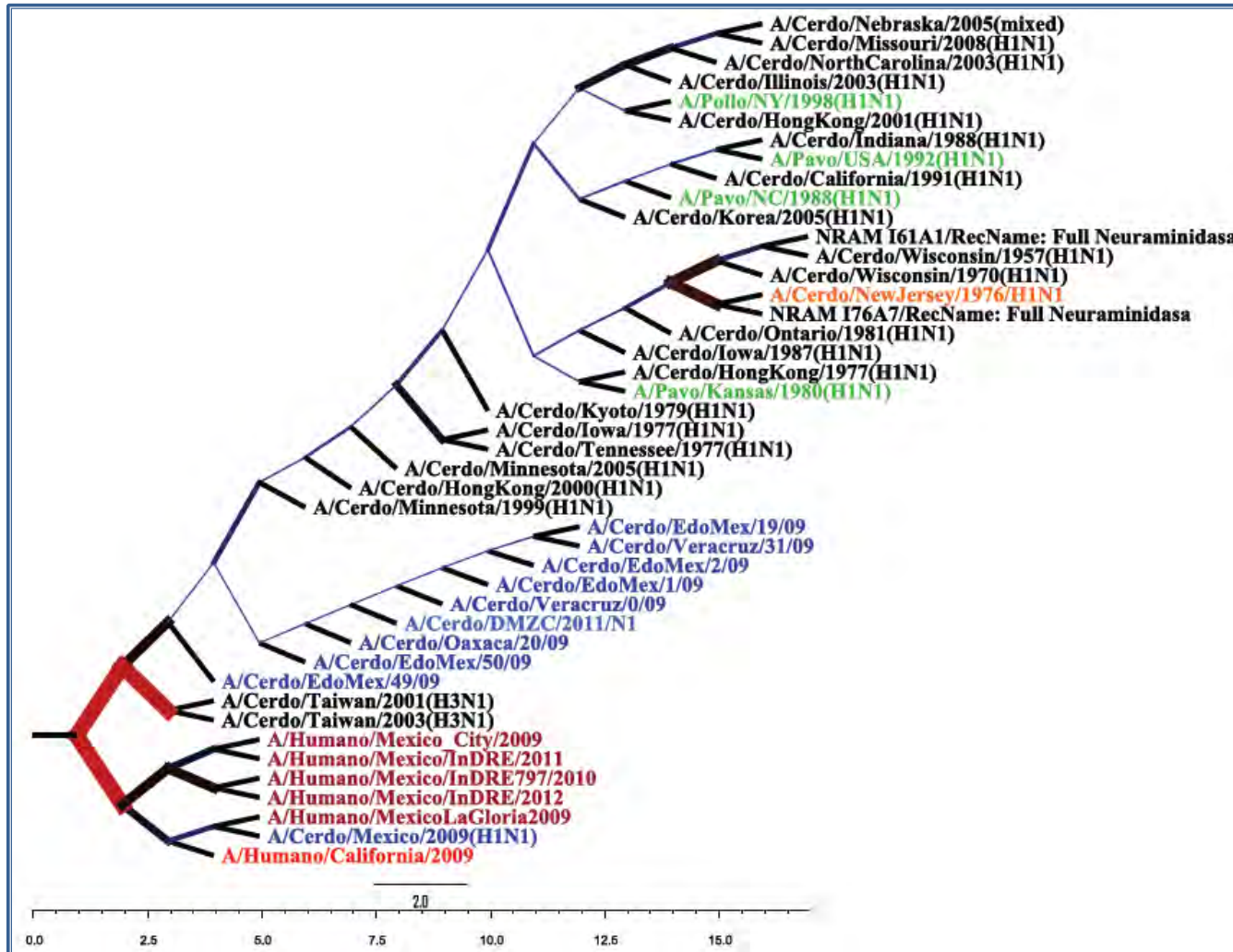


Figura 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del segmento N1 a partir de muestras clínicas y virus referencia, se presentan secuencias en aminoácidos con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. El color de los taxones indica el huésped; negro=cerdo estacional, azul=cerdo periodo 2009-2011, verde=aviar, rojo=humano pandémico, naranja =virus referencia.

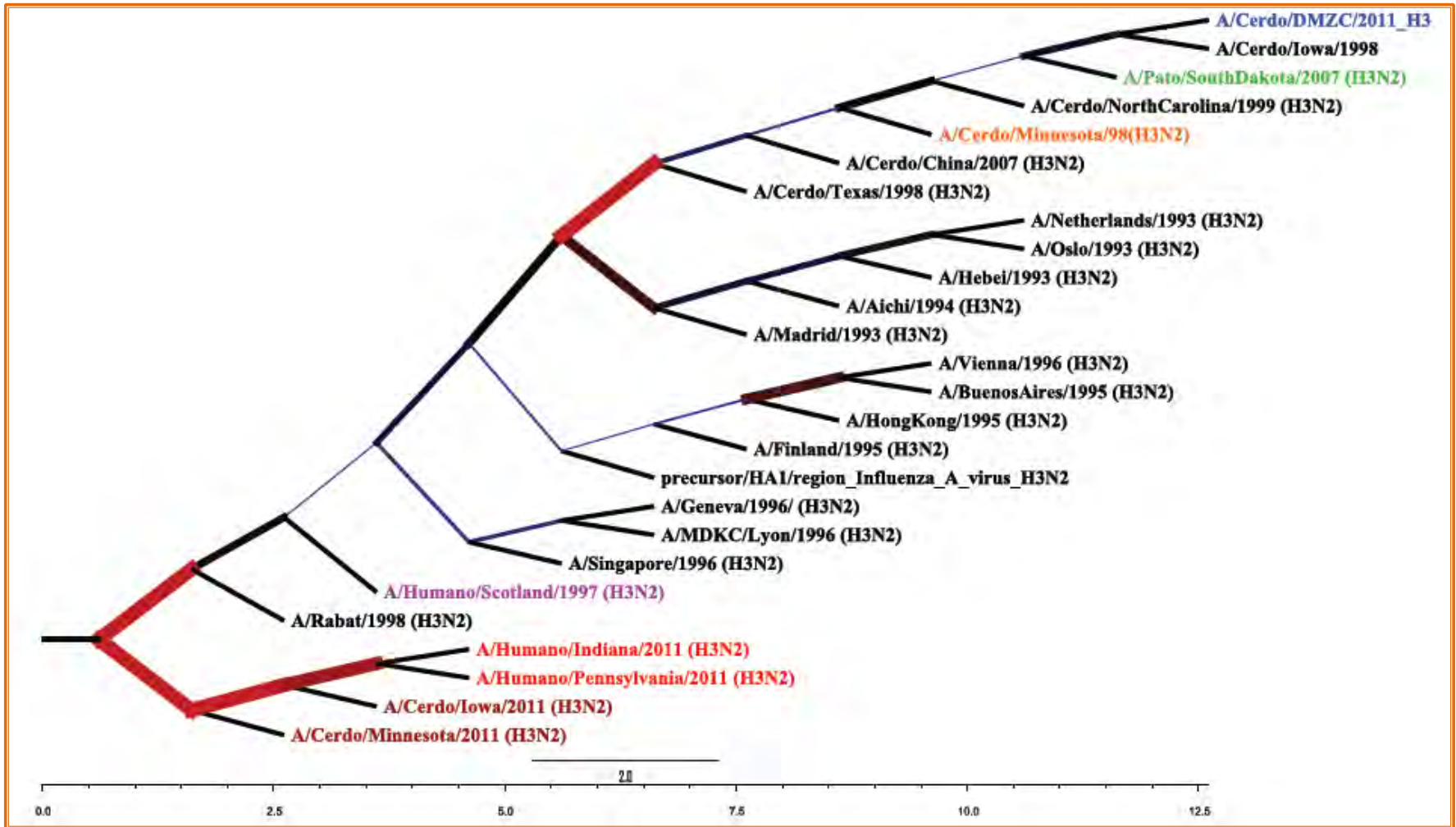


Figura 12. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento H3 a partir de secuencias en aminoácidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. El color de los taxones indica el huésped; negro=cerdo estacional, azul=cerdo periodo 2009-2011, verde=aviar, rojo=humano pandémico, naranja =virus referencia, morado=humano estacional.

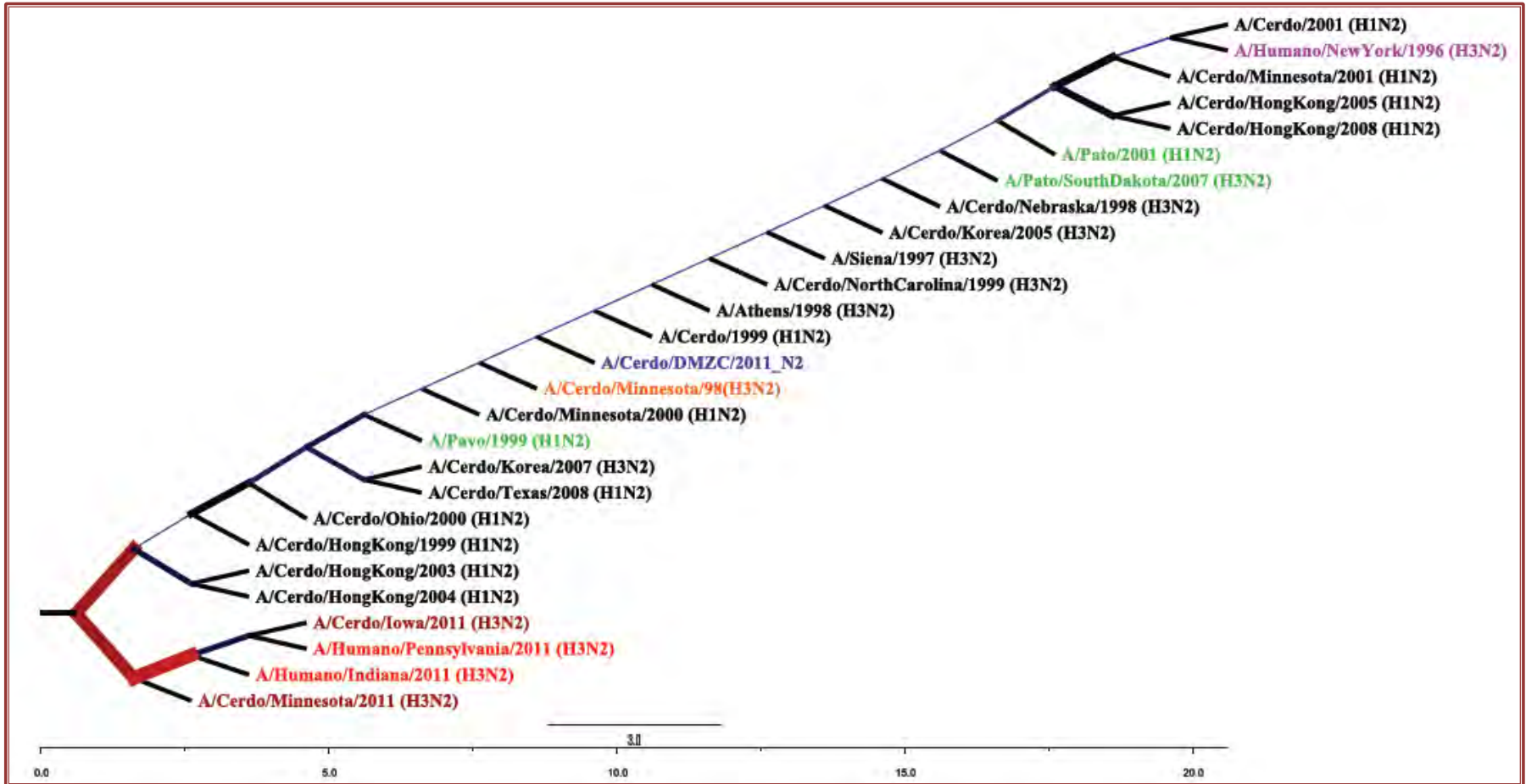


Figura 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del virus referencia segmento N2 a partir de secuencias en aminoácidos y secuencias con mayor porcentaje de identidad en el Genbank. El color de los taxones indica el huésped; negro=cerdo estacional, azul=cerdo referencia, verde=aviar, rojo=humano pandémico, naranja =virus referencia, morado=humano estacional.