

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**Estudio de la adaptación evolutiva de los virus de la Necrosis Hipodérmica
y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) e Influenza A (H1N1) mediante un
enfoque experimental y bioinformático**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SARAHÍ VEGA HEREDIA

Ensenada, Baja California, mayo del 2015

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA

**Estudio de la adaptación evolutiva de los virus de la Necrosis
Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) e Influenza
A (H1N1) mediante un enfoque experimental y bioinformático**

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA


Sarahí Vega Heredia

Aprobada por:

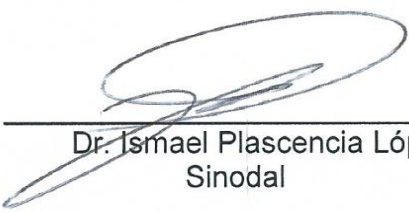
HAReyes

Dr. Horacio Almanza Reyes
Director de tesis


Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal


Dra. Myrna del Carmen Brito Perea
Sinodal


Dra. Aracely Serrano Medina
Sinodal


Dr. Ismael Plascencia López
Sinodal

DEDICATORIA

A mis amados padres Margarita Heredia Quezada y Sergio Vega Castro

A mis sobrinas Azul Vega, Janice Vega, Violetita Vega, Aislin Cortez, Arlen
Quiroz, Alejandra Sánchez, Isabella Díaz e Isabella Félix

A mis tías mamas Martha Elena Heredia Quezada, Gloria Alicia Heredia
Quezada y Josefina Quezada Luque

A mis hermanos Tania Vega Cortez, Paul Vega Cortez y Sergio Vega Heredia

A mis amigas de la niñez y de siempre, Carmen A. y Myrna P. Quezada López,

AGRADECIMIENTOS

A mi perseverancia y fortaleza, inspirados por el gran respeto y amor que siento por la ciencia. Yo vivo de preguntar, soy y seré una niña que pregunta, (Escaramujo, Silvio Rodríguez).

En primer lugar, mi más sincera gratitud a mi tutora, la Dra. Ivone Giffard Mena. Por tu infinita paciencia y tolerancia a mi espíritu rebelde. Me diste la libertad de volar, caer, levantarme y pasar por una cantidad enorme de obstáculos; de vivir la experiencia del camino. Si lo logré, es porque a pesar de todo, siempre me apoyaste. Mi respeto para ti querida Jefa.

Muchas gracias por tu apoyo incondicional doctora Refugio Robles Sikisaka.

A mi familia, Moreno Quezada, Carrillo Heredia, Machado Quezada, principalmente a mi queridísimo primo, Luis Ángel Moreno, que bellos y divertidos momentos pasamos, en tu querida Tijuana.

A mis caseros de Tijuana, Leopoldo Meza y Ana María de Meza, que ahora son mi familia, los respeto y admiro porque son excelentes personas.

A los doctores, Arturo Sánchez Paz, Carlos A. Flores López, María T. Viana Castrillón, Adriana T. Muhlia Almanza, Eugenio Carpizo Ituarte, Axayacatl Rocha, Enrique de la Re y a la M.C. Alma B. Peregrino Uriarte.

Al personal administrativo de CIBNOR, CIAD de Hermosillo y a la secretaria de posgrado de la FCM-UABC, Angélica.

Al personal del laboratorio de virus respiratorios del INDRE, especialmente a los químicos Carlos H. Fuentes y Jorge R. Floriani.

A mis compañeros del laboratorio 3 de Medicina y Psicología de la UABC-Tijuana, Carlos Cota, Carolina Carrión, Román Chávez, Iván Velasco y Luis Montes. Principalmente a Judith Lerma, nos divertíamos mucho cultivando células e ideando estrategias para rescatar la línea celular SP2.

A mi compañera de generación del doctorado Dra. Jennyfers Chong (ÑOÑIS), fuiste mi apoyo en los momentos más difíciles del doctorado. Gracias ñoñis!

Al Centro Educativo Tijuana (CET), especialmente a la M.C. Leticia Silva Guerrero, me dio una de las oportunidades más maravillosas de mi vida, dar clases de ciencia a unos diablillos de secundaria, que quise mucho. Esta experiencia marcó mi vida.

A la biblioteca de la UNAM-Ensenada, por permitirme bajar todos los artículos que necesité para la realización de esta tesis. Su personal siempre mostró educación y amabilidad.

Al CONACYT por la beca (210036) que me otorgó para la realización del doctorado

Índice

Prefacio	VII
I. Introducción	1
I.1. Generalidades sobre los virus	1
I. 2. Características generales del IHHNV	2
I.2.1. Virulencia del IHHNV	2
I.2.2. Resistencia de los peneidos al IHHNV	3
I.2.3. Co-evolución entre el IHHNV y su huésped	4
I.2.4 Endogenización de secuencias de genomas virales y su utilidad inmunológica	4
I.3. Características generales de la influenza subtipo A (H1N1)	5
I.3.1. Subtipos virales de la influenza	6
I.3.2. Variabilidad genética del antígeno HA de influenza subtipo A (H1N1)	7
I.3.3. Pandemias del virus de la influenza subtipo A (H1N1)	8
II. Hipótesis	10
III. Objetivo general y objetivos específicos	10
IV. CAPÍTULO I. El virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV): Un breve repaso de lo que hacemos y no sabemos	11
IV.1. Introducción	12
Artículo 1. The Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus: A brief review of what we do and do not know.	15

IV.II Puntos claves del capítulo I	26
V. CAPÍTULO II. Detección de falsos positivos del IHHNV en procedimientos de diagnóstico actuales	28
V. I. Introducción	29
Artículo 2. False positive detection of IHHNV in current diagnostic procedures	33
V.II Puntos clave del capítulo II	55
VI. CAPÍTULO III. Evolución molecular de la hemaglutinina del virus de influenza A (H1N1) en México durante 2009 - 2012	56
VI.1. Introducción	57
VI.1.1. Clasificación y nomenclatura de la familia Orthomyxoviridae	57
VI.1.2. Organización del genoma	58
VI.1.3. Características de la glicoproteína HA	59
VI.1.4. Tasa de mutación del virus de influenza y epidemiología	60
VI.1.5. Deriva antigénica	61
VI.1.6. Selección positiva	62
VI.2. Materiales y métodos	64
VI.2.1. Bases de datos	64
VI.2.2. Análisis filogenético	64
VI.2.3. Análisis de recombinación y selección positiva	65
VI.3. Resultados	67
VI.3.1. Inferencia filogenética de los tres clados	67
VI.3.2. Probabilidad posterior Bayesiana y Porcentaje de identidad	68

VI.3.3. Recombinación y selección positiva	69
VI.4. Discusión	75
VI.4.1. Clado uno, representado por la variante vacunal A/California/07/2009	75
VI.4.2. Cambios de aminoácidos en la subunidad HA1 del virus de la influenza A (H1N1)pdm 09 desde el 2009 – 2014	76
VI.4.3. Clado dos representado por la variante viral A/Solomon Islands/3/2006	78
VI.4.4. Clado uno y tres, son representados por variantes virales porcinas	78
VI.5. Conclusiones	82
VI.6. Puntos clave del capítulo III	83
VII. CAPÍTULO IV. Co-evolución de los virus y su huésped	84
VII.1. IHHNV, infección persistente: Co-evolucionando con el enemigo	85
VII.1.2. Infección persistente en artrópodos	86
VII.1.3. Endogenización de parvovirus en el genoma de eucariotas	87
VII.1.4. Ventajas y desventajas de los elementos movibles en el genoma de los organismos	89
VII.2. Dinámica evolutiva del virus de influenza subtipo A (H1N1)	93
VII.3. Conclusión	96
VII.4. Puntos clave del capítulo IV	97
VIII. CAPÍTULO V. Producción de anticuerpos monoclonales para conocer los cambios evolutivos de los aminoácidos de la proteína HA de los virus de influenza A (H1N1)	98
VIII. 1. Introducción	99

VIII.1. 1. ¿Qué son los anticuerpos monoclonales?	99
VIII.1.2. Importancia y aplicación de los AcMo	99
VIII.2. Materiales y métodos	104
VIII.2.1. Obtención del inóculo H1N1	104
VIII.2.2. Mantenimiento de la línea celular para la producción de AcMo	104
VIII.2.3. Amplificación del virus de influenza A (H1N1) en embriones de pollo	105
VIII.2.4. Cosecha del virus de influenza	106
VIII.2.5. Prueba de la hemaglutinación	106
VIII.2.6. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR	107
VIII.3. Resultados	108
VIII.4. Dificultades para lograr este objetivo específico	109
VIII.4.1 Burocracia de las instituciones	109
VIII. 4.2. Amplificación del virus de influenza A (H1N1) en embriones de pollo	109
VIII.6. Puntos clave del capítulo V	114
IX. Referencias	115
Anexo I. Secuencias de nucleótidos del virus de la influenza A (H1N1) del gen completo de hemaglutinina (HA) del GenBank.	130

Índice de figuras

Capítulo	Figura		Página
I	1	Representación esquemática de la organización del genoma del IHHNV.	19
II	1	Síntomas del IHHNV y detección por PCR en el camarón subadulto <i>L. vannamei</i> con los primers 309F/R, 77012F/77353R, IHF2544/R3759, MG831F/R Y 392F/R	52
	2	Detección por PCR del IHHNV en el camarón subadulto <i>L. vannamei</i> con los primers 309F/R, 77012F/77353R, IHF2544/R3759 y 392F/R	53
	3	Detección por PCR del IHHNV en post-larvas de <i>L. stylirostris</i> con los primers 309F/R, 77012F/77353R, IHF2544/R3759 y 392F/R	54
III	1	Árbol filogenético para el gen de HA de los virus de influenza A (H1N1), durante el periodo 1978 – 2014, realizado con el programa filogenético Mr. Bayes.	72
	2	Árbol filogenético circular, para el gen de HA de los virus de influenza A (H1N1), durante el periodo 1978 – 2014.	73
	3	Árbol filogenético para el gen de HA de los virus de influenza A (H1N1), durante el periodo 1978 – 2014, realizado con el programa filogenético BEAST.	74
V	1	Diagnóstico del virus de influenza por la prueba de hemaglutinación y RT-PCR	110
	2	Amplificación y criopreservación de la línea celular P3X63Ag8.653 (Murine Myeloma)	111
	3	Inoculación y cosecha del virus de influenza A (H1N1) en embriones de pollo	112

Índice de tablas

Capítulo	Tabla		Página
I	1	Distribución geográfica del IHHNV	17
	2	Huéspedes del IHHNV de forma natural y experimental	18
II	1	Lista de primers para la detección del IHHNV	51
III	1	Mutaciones sinónimas y no-sinónimas de los virus de influenza A (H1N1) en los tres clados.	71
V	1	Vacunas recomendadas para los subtipos de influenza A (H1N1)pdm, A (H3N2) y subtipo B durante el 2014 – 2016	113

PREFACIO

Este trabajo fue realizado con la idea de profundizar sobre la importancia evolutiva y los beneficios que los virus les proporcionan a sus huéspedes ya que en el colectivo común existe la ideología que toda infección vírica provoca una enfermedad, sin embargo proporcionalmente al número de virus que existen, son pocas las infecciones víricas que originan síntomas de enfermedad. Los virus son parásitos obligados que se han especializado en insertar su material genético dentro del genoma de la célula huésped y han perfeccionado a lo largo de la historia evolutiva diversas estrategias para co-existir con su huésped. Por ello existe la hipótesis de que el genoma de la mayoría de los organismos se originó a partir de genomas virales.

La transferencia de información genética entre diversas especies de organismos permite la adquisición de nuevas propiedades evolutivas, que puede otorgar ventajas o desventajas adaptativas al organismo que hereda las secuencias genómicas. En los últimos años algunas especies de virus del grupo de los parvovirus como por ejemplo el virus IHNV producen infecciones persistentes en crustáceos, sin desarrollo de enfermedad aparente. La persistencia viral está relacionada con su capacidad de integrarse al DNA cromosómico de sus huéspedes, debido a esto han co-evolucionado junto con sus huéspedes, derivando en una adaptación selectiva positiva.

Un ejemplo importante de co-evolución ocurre en el camarón *Penaeus monodon*, éste es infectado de forma persistente por el parvovirus IHNV y no

desarrolla enfermedad en el crustáceo. El virus de la influenza subtipo A H1N1 también ha co-evolucionado con sus huéspedes (aviar, porcino y humano), debido a que presenta bajas tasas de cambio evolutivo en las aves, con una gran capacidad de adaptación y equilibrio. El estudio de la adaptación selectiva de los virus, se ha abordado recientemente en la genómica comparativa mediante métodos evolutivos computacionales y las técnicas moleculares básicas como el PCR, bioensayos con organismos vivos y cultivo celular, secuenciación de genomas, entre otras técnicas. En esta Tesis abordamos una perspectiva integral para comprender mecanismos de co-evolución comparando al modelo humano y al camarón.

I. Introducción

I.1. Generalidades sobre los virus

Los virus son parásitos obligados e intracelulares, carecen de información genética que codifique estructuras necesarias para la generación de energía metabólica o para la síntesis de proteínas. Son dependientes de la célula huésped, por lo tanto están vivos mientras estén dentro de esta y son ensamblajes químicos metabólicamente inertes fuera de la célula (Cann, 2009). Los virus son las entidades biológicas más abundantes y diversas en la tierra. Están presentes en todos los ambientes explorados, son capaces de infectar a todos los organismos de los tres reinos de la vida (archaea, bacteria y eucariota), además de otros virus (Feschotte y Gilbert, 2012; Koonin y Dolja, 2013). La composición y estructura de los genomas virales es más variada que los genomas de los reinos bacteriano, vegetal y animal. Los ácidos nucleicos son de una sola cadena o doble cadena, su configuración es linear, circular o segmentada. La polaridad de sus genomas es positiva (la misma polaridad o secuencia nucleotídica que el mRNA), polaridad negativa ó ambisentido (Cann, 2009). Debido a la estructura genómica que presentan los virus, tienen un papel muy importante en la transición evolutiva celular (Banda, 2009). Ya que los ácidos nucleicos virales al infectar células del huésped evolucionan mediante recombinación y mezcla de material genético entre ambos (Koonin y Dolja, 2013, Feschotte y Gilbert, 2012; Flegel, 2009). Esta transferencia genética entre

los organismos y los virus permite la adquisición de ventajas o desventajas adaptativas (Dunning, 2011). Todas las células, animales y vegetales son susceptibles de ser infectadas por virus de manera específica.

I. 2. Características generales del IHHNV

El virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa IHHNV, es una de las enfermedades infecciosas virales que merecen mayor atención por su frecuencia de aparición, su capacidad de producir severas epizootias con altas mortalidades y considerables pérdidas económicas a la industria del cultivo de *L. stylirostris* y *L. vannamei* (Lightner, 1988 y 1996). Este virus pertenece taxonómicamente a la familia Parvoviridae por las siguientes características: su diámetro es de 18-26 nm, con simetría icosaédrica, carece de envoltura, contiene un DNA uncatenario lineal (cubierto por la cápside como hebra positiva o negativa), de un tamaño estimado de 3.9-5.9 kb (Berns et al., 1995). Por medio de la técnica electroforesis desnaturizante en poliacrilamida (SDS-PAGE) se determinó que la cápside del virus está formada por cuatro polipéptidos con peso molecular de 74, 47, 39 y 37.5 kD (Bonami et al., 1990).

I.2.1. Virulencia del IHHNV

Los peneidos adultos infectados con IHHNV que han superado una epizootia, no desarrollan signos macroscópicos importantes por lo tanto no son susceptibles a este virus ya que no muestran síntomas de la enfermedad y tampoco mortandad, en cambio los juveniles de *P. stylirostris* de tamaño

pequeño (5.0 mg a 3.7 g) presentan mortalidades masivas (Lightner et al., 1983). La severidad de la infección es mayor para *L. stylirostris*, en *L. vannamei* solo se manifiesta como el síndrome de deformidad y enanismo o RDS (por sus siglas en inglés), presentándose en esta especie como un agente de enfermedad crónica, sin grandes mortalidades (Bell et al., 1984; Kalagayan et al., 1991). Es importante mencionar que los individuos de *P. stylirostris* y *P. vannamei* que están infectados y que sobreviven a las epizootias del IHHNV son portadores de este virus el cual se transmite a un nuevo lote de cultivo tanto de forma vertical (presente en el genoma de los huevos) como horizontal (por ingestión de las heces como por eventos de canibalismo) (Motte et al., 2003; Lightner, 1996).

I.2.2. Resistencia de los peneidos al IHHNV

Las especies de peneidos resistentes ó no susceptibles al IHHNV son *P. monodon*, *I. indicus* y *L. merguensis* (Lightner, 1996). En adultos de *P. monodon* infectados de forma persistente por el IHHNV, no se observan los signos clínicos antes mencionados y solo se ha reportado una disminución en la tasa de fecundidad (Withyachumnarnkul et al., 2006). Las razones de la resistencia de esta especie ante esta enfermedad no son totalmente comprendidas. Se desconoce lo que ocurre a nivel celular y molecular con los organismos sobrevivientes ante las infecciones persistentes provocadas por el IHHNV, solo se les llama resistentes, el conocimiento sobre el tema es muy limitado. A continuación se presentan algunas posibles explicaciones.

I.2.3. Co-evolución entre el IHHNV y su huésped

Es necesario comprender la interacción co-evolutiva que ocurre entre el virus y su huésped. Comprender esta interacción nos permitirá conocer de forma integral la infección vírica. Algunos investigadores señalan que los ácidos nucleicos virales evolucionan a partir de las células que infectan, mediante recombinación, duplicación genética y mezcla de material genético de los virus con sus hospederos (Koonin y Dolja, 2013; Feschotte y Gilbert, 2012; Flegel, 2009; Bandea, 2009). La simbiosis o infección persistente propicia un delicado balance entre el virus y el huésped, en el cual el virus ajusta su replicación y patogenicidad para evitar la muerte del huésped (Cann, 2009).

Existe la hipótesis de que el IHHNV, se podría adaptar a sus hospederos *L. vannamei* y *L. stylirostris* mediante selección positiva. Esto es, incrementando la frecuencia de variantes, que otorgan ventajas adaptativas y diversidad genética a las poblaciones virales (Posada, 2009).

I.2.4. Endogenización de secuencias de genomas virales y su utilidad inmunológica

Es posible que secuencias del genoma del IHHNV se puedan integrar al genoma del camarón. Se tienen registros de que la familia Parvoviridae ha integrado secuencias de sus genomas en los genomas de sus huéspedes desde hace 50 millones de años de evolución (Belyi et al., 2010). Por ejemplo, el Dependovirus AAV2 cuando infecta al humano, se integra en el cromosoma

19, como parte de su estrategia de replicación (Belyi et al., 2010). Las secuencias endógenas modifican la evolución del genoma de su huésped y alteran la expresión de genes para su beneficio (Daubin y Ochman, 2004). Otra hipótesis propone que las recientes endogenizaciones de secuencias de genomas virales en los genomas de artrópodos, operan como memoria de DNA, que activa su sistema inmune adaptativo (Flegel, 2009; Daubin y Ochman, 2004; Kazazian, 2004; Goic y Saleh, 2012). Un ejemplo es el sistema de defensa antiviral RNA de interferencia (iRNA) (Labreuche y Warr, 2012), el cual destruye el material genético ajeno e inactiva los virus dejándolos en latencia mediante la regulación de su replicación, sin causar signos de infección en el huésped (La Fauce y Owens, 2012; Goic y Saleh, 2012; Labreuche y Warr, 2012). Es importante investigar más eventos de integración, patogénesis y los mecanismos de persistencia del IHHNV ya que siguen siendo desconocidos. El conocimiento sobre estos temas proporcionaría información importante sobre los procesos de selección positiva adaptativa del genoma y co-evolución entre el virus y su huésped.

I.3. Características generales de la influenza subtipo A (H1N1)

Otro virus en el cual se han presentado procesos infectivos y evolutivos que ameritan ser estudiados, es el virus de la influenza subtipo A (H1N1) por su alta variabilidad genética y antigénica. La infección respiratoria aguda causada por el H1N1 es un problema de salud pública que ha causado la muerte de alrededor de 50 millones de personas en el mundo, y cada año permanece

como una amenaza a la salud pública (Taubenberger et al., 2006). Este virus se clasifica taxonómicamente en la familia Orthomyxoviridae, consta de ocho y siete segmentos de RNA de cadena simple y tiene polaridad negativa (Duesberg, 1967; Cheung y Poon, 2007; Bouvier y Palese, 2008). Se clasifica en subtipos debido a que las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) determinan el alto grado de variabilidad antigénica, por lo que las secuencias de estas proteínas se utilizan para clasificar a los virus cuando aparecen nuevas cepas. Estudios filogenéticos han descrito que únicamente el subtipo A es el responsable de los 16 subtipos de HA denominados (H1-H16), y nueve subtipos de NA (N1-N9) (Laver et al., 1984; Cheung y Poon, 2007). Solo tres subtipos HA (H1, H2 y H3) y dos NA (N1 y N2) han causado epidemias humanas mediante la transmisión de persona a persona (Bouvier y Palese, 2008). La proteínas HA y NA, son los principales antígenos del virus contra la respuesta inmune (Laver et al., 1984; Cheung y Poon, 2007).

I.3.1. Subtipos virales de la influenza

El subtipo de influenza A infecta al humano, cerdos, caballos, mamíferos marinos y varias especies de pájaros (Carrat et al., 2007; Webster et al., 1992; Robert et al., 1992). Estudios filogenéticos de los virus de la influenza A, han demostrado que en las aves silvestres acuáticas este virus está muy adaptado y presenta poca variabilidad genética. Se ha propuesto la hipótesis, que las aves acuáticas son el origen de todos los virus de la influenza en otras especies

(Robert et al., 1992). Los subtipos de influenza A más comunes en humanos y cerdos son H1N1, H1N2, H3N2, son cosmopolitas, pero su origen, características antigénicas y genéticas, se diferencian entre las distintas regiones geográficas (Kuntz et al., 2009). Diversos estudios han evidenciado que el cerdo es una especie reservorio en la que se generan las nuevas variantes recombinantes del virus de la influenza que se transmite a otras especies de organismos con potencial pandémico en la población humana (Ito et al., 1998; Campitelli et al., 1997; Chen et al., 2005; Dawood et al., 2009). Durante este siglo han surgido diversas cepas de influenza, debido a la recombinación genética aviar, humana y porcina, estas variantes virales han sido responsables de las epidemias y pandemias en el mundo.

I.3.2. Variabilidad genética del antígeno HA de la influenza subtipo A (H1N1)

El virus de la influenza subtipo A (H1N1) produce epidemias y pandemias humanas ocasionadas por la alta sustitución de aminoácidos dentro de los sitios de unión en sus antígenos Hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (Carrat y Flahault, 2007). Esta variabilidad en los antígenos no permite que los anticuerpos los reconozcan. La sustitución de aminoácidos proviene de mutaciones (deriva genética), selección natural y recombinación de los segmentos de RNA en diferentes especies (Chen y Holmes, 2006; Domingo, 2006). La glicoproteína HA es la responsable de la unión del antígeno viral al receptor de tipo ácido siálico en los enlaces α -2,6 y en menor grado en el enlace α -2,3 y también controla la fusión viral de la membrana celular del

huésped (Couceiro et al., 1993; Cheung y Poon, 2007; Nayak et al., 2009). La síntesis de la conformación de HA se origina por un polipéptido precursor (HA₀) durante su post-traduccion, su estructura se basa en dos subunidades HA₁ y HA₂ enlazadas por un enlace disulfuro, la escision de esta proteina en HA₁ y HA₂ es importante para la infectividad viral (Cheung y Poon, 2007).

I.3.3. Pandemia del virus de la influenza subtipo A (H1N1) en México

En México en el año 2009, surgió una nueva variante inusual del virus de la influenza A (H1N1). El país no contaba con la capacidad para identificar a este virus, por ello los centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, reportaron a la Organización Mundial de la Salud, que este virus surgió por una recombinación interespecífica de sus genes (porcino, aviar y humano) (Dawood et al., 2009; Trifonov et al., 2009). El H1N1 variante mexicana se expandió a 43 países registándose 12,515 casos de los cuales 91 personas infectadas murieron (Trifonov et al., 2009).

El estudio de la dinámica evolutiva de los virus de influenza, facilita la comprensión de su epidemiología. El estudio de Moya et al., 2004, estableció la fuente del brote viral; mediante un árbol filogenético se construyó su historia epidemiológica (se determinó su origen, se identificó la variante viral actual y se estimaron las probabilidades futuras de supervivencia de variantes de virus de influenza. El objetivo de reunir toda esta información fue conocer al virus de la gripe para anticipar vacunas cuando una nueva epidemia comience a emerger. Es importante mencionar que las variantes de virus de influenza mexicanas son

diferentes genética y antigénicamente, en función de su ubicación geográfica. Sin embargo en México, a la fecha no existen investigaciones dirigidas a entender la dinámica evolutiva del virus de influenza, a pesar del incremento inusual de influenza pandemia presentada en los últimos años. Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo es, evaluar algunos mecanismos de adaptación evolutiva de los virus IHHNV y H1N1, con sus respectivos hospederos mediante un enfoque experimental y de bioinformática.

II. Hipótesis

La adaptación selectiva de los virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) y de la Influenza subtipo A (H1N1) y será positiva a los cambios celulares e inmunológicos de sus huéspedes naturales.

III. Objetivo general

Discernir los mecanismos de adaptación evolutiva de los virus IHHNV, y A (H1N1) con sus respectivos hospederos mediante un enfoque experimental y de bioinformática.

Objetivos específicos

- 1.-Evidenciar el estado actual del conocimiento sobre el virus IHHNV en decápodos.
- 2.- Evaluar la endogenización del IHHNV en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y camarón azul *Litopenaeus stylirostris* mediante un estudio experimental.
- 3.- Investigar los procesos de adaptación evolutiva del virus A (H1N1) durante la pandemia del 2009 en la población mexicana mediante análisis bioinformático.
- 4.- Definir los procesos de co-evolución del IHHNV y el A (H1N1) en sus respectivos huéspedes.
- 5.- Producir anticuerpos monoclonales para conocer los cambios evolutivos de la proteína HA de los virus de influenza A (H1N1).

IV. Capítulo I

El virus de la Necrosis

Hipodérmica y Hematopoyética

(IHHNV): Un breve repaso de lo

que hacemos y no sabemos

IV. I.Introducción

La camaronicultura es una de las ramas de la acuicultura que más se ha desarrollado en los últimos 15 años a nivel mundial. En México el cultivo de camarón inició en 1985, incrementándose la producción y el área de cultivo de manera progresiva en los últimos años. Las especies más importantes desde el punto de vista productivo y comercial pertenecen a la familia Penaeidae y son: *Penaeus vannamei*, que tiene un color blanquecino o ligeramente amarillento, y *Penaeus stylirostris*, que tiene un color ligeramente azulado (Martínez-Córdova et al., 2002).

Las enfermedades infecciosas virales han causado epizootias y pérdidas económicas considerables a la industria del cultivo de camarón. Hasta fines de 1988 solamente se habían reportado seis virus capaces de afectar al género *Penaeus*, y para 1996 el número se había incrementado a más de 20 (Lightner, 1988 y 1996). En el continente americano los agentes virales que merecen mayor atención por su aparición frecuente, amplia distribución, capacidad de causar epizootias con altas tasas de mortalidad, además de producir pérdidas económicas de miles de millones en la industria de camarones peneidos son: En primer lugar el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) que ha causado pérdidas económicas de ocho mil millones, en segundo lugar el Virus del Síndrome de Taura (TSV) con pérdidas de tres mil millones y en tercer lugar el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) con pérdidas de mil millones (Lightner, 2011).

En México a raíz de la epizootia que causó el IHHNV a *P. stylirostris* en la década de los 90s, se optó por suspender su cultivo y cultivar en cambio al camarón blanco *P. vannamei*, que es, como ya se mencionó, menos susceptible a este virus (Morales Covarrubias, 1999). No se ha tomado en cuenta que el IHHNV está mutando continuamente (Robles-Sikisaka et al., 2010) y que *P. vannamei* podría estar perdiendo variabilidad genética debido al rápido desarrollo productivo sin control en el manejo de sus poblaciones, lo cual podría generar en pérdida de variabilidad genética y por lo tanto incrementar su susceptibilidad a enfermedades (Rivera-García y Grijalva-Chon, 2006). Eliminar el cultivo de *P. stylirostris*, susceptible al IHHNV y solamente producir *P. vannamei* resistente al IHHNV, no es la solución al problema. Aun se sabe poco sobre los aspectos fisiológicos, genéticos, patogénicos, provocados por el IHHNV en sus hospederos, a pesar de que el IHHNV es una de las amenazas más serias para la industria camaronícola (JSA Shrimp Virus Work Group, 1997) Por lo anterior el objetivo principal de este primer capítulo es recapitular la información disponible sobre el virus IHHNV en decápodos, esta información nos facilitará comprender su epidemiología. La investigación ha sido publicada y se presenta a continuación en su formato final.

Artículo 1

(Publicado)

**The Infectious Hypodermal and
Haematopoietic Necrosis Virus: A
brief review of what we do and do
not know**

REVIEW

The Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus: A Brief Review of What We Do and Do Not KnowS. Vega-Heredia¹, F. Mendoza-Cano² and A. Sánchez-Paz²¹ Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México² Laboratorio de Análisis Integral Acuicola, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Hermosillo, Sonora, México**Keywords:**

emerging diseases; virus; wildlife; pathogenesis

Correspondence:Dr A. Sánchez Paz. CIBNOR, PO Box 83260, Hermosillo, Sonora, México.
Tel.: 52 (662) 2 13 15 93;
Fax: 52 (662) 2 12 12 01;
E-mail: asanchez04@cibnor.mx

Received for publication June 13, 2011

doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01249.x

Summary

Given its high prevalence, its wide distribution and its remarkable capacity to cause severe mortality in shrimp, the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) may deserve far more attention than it has received, as it remains considered as one of the most serious problems plaguing the global shrimp farming industry. Furthermore, its real measurable impact over wild shrimp populations remains unknown. Undeniably, the progress that we have reached today on the knowledge of its geographical distribution, clinical signs, genetic diversity, transmission and virulence may help to identify and understand important aspects of its biology and pathogenesis. However, the information regarding the molecular events that occur during the infection process is scarce. Thus, it may not be surprising to find that there are no therapeutic options available for the prophylaxis or treatments to reduce the deleterious impact of this viral pathogen to date. The aim of this review is to integrate and discuss the current state of knowledge concerning several aspects of the biology of IHHNV and to highlight potential future directions for this area of research.

Introduction

Even when marine viruses were described for the first time by Spencer (1955), their existence remained largely ignored because of the relatively low abundances inferred through the use of cultured-based assays (Breitbart et al., 2007). It was not until 1989, when Bergh and colleagues reported high abundances of viruses in aquatic environments, that the attention was focussed on the environmental and epidemiological roles of marine viruses.

Besides being important catalysts of biogeochemical cycling influencing the availability of nutrients on the sea (Fuhrman, 1999), a vast reservoir of genetic and biological diversity, and a key factor driving the evolution of its hosts (Suttle, 2007), marine viruses probably infect all living organisms inhabiting seawaters (Suttle, 2005), and as a consequence they are a major cause of diseases and mortality in the oceans (Suttle, 2007). It is clear that marine viruses infect several commercially important cultivated species, such as fish and shrimp, and for this reason they have been intensively studied.

In recent years, several viral diseases have caused critical economic losses to the global shrimp-farming industry (Chamberlain, 1994). To date, more than 20 viruses have been reported to infect cultured and wild shrimp (Lightner, 1994; Overstreet, 1994). Among these viruses, the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) represent one of the most serious threats to the cultured shrimp industry and the shrimp fishery (JSA Shrimp Virus Work Group, 1997). Thus, this review provides a brief overview of the current science on IHHNV and identifies areas for further development regarding this virus.

History, Clinical Signs and Geographical Distribution of IHHNV

During the early 1980s, the population of *Penaeus stylirostris* reared at the University of Arizona's experimental shrimp culture facility on Hawaii were severely affected by a highly lethal disease of viral aetiology. Examination by electron microscopy and histopathology of specimens

of *P. stylirostris*, *P. monodon* and *P. vannamei* naturally infected with IHNV showed the presence of large conspicuous eosinophilic intranuclear inclusions (type A), resembling those described by Cowdry (1934) in ectodermally and mesodermally derived tissues (Lightner et al., 1983a). Thus, to describe the principal lesions caused by this disease, it was named infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) (Lightner et al., 1983a,b).

While the IHHN disease detected in juveniles of *P. stylirostris* resulted in mortality rates of 90% of the affected population, populations of *P. vannamei* were shown to be susceptible to carry the disease but no mortalities were observed (Lightner et al., 1983b). As *P. stylirostris* was the only species severely affected, these observations suggested a disease of species-specific viral aetiology in terms of gross manifestations (Bell and Lightner, 1984). The viral aetiological agent IHNV was subsequently isolated from a diseased host and, according to the Koch's postulates, passed by a cell extract to a susceptible host in which the diseased host was manifested later. Findings from this event, by histological examinations and using light microscopy, provided evidence that the IHHN disease was caused by a virus (Bell and Lightner, 1984).

Lightner et al. (1983b) reported that IHNV was imported into Hawaii with penaeid populations originated from South or Central America and suggested that the virus is enzootic in penaeid culture farms where *P. stylirostris* and *P. vannamei* were grown in those regions.

The first recognizable signs in *P. stylirostris* are lethargic surface swimming followed by motionless, inverted sinking to the bottom, muscle opacity, lack of mobility and death. It has been reported that the disease is more severe in groups of small-sized animals (5.0 mg to 3.7 g) than in larger-sized groups (14.5–36.9 g) (Bell and Lightner, 1984, 1987). Besides, it is worth noting that *P. stylirostris* specimens surviving IHNV may become carriers and transmitter of the virus for life, despite the absence of evident gross signs of disease (Bell and Lightner, 1987). Thus, vertically infected larvae and early post-larvae undergo mass mortalities when reaching the juvenile state (Lightner, 1996). In contrast, the impact of this virus in other penaeid species is not so severe. In *P. vannamei*, it has been associated with runt deformity syndrome (RDS), causing significant reduction on the growth rate and cuticular deformities as bent rostrum, blistered cuticle, bent telson, abdominal anomalies and curly antennae (Kalagayan et al., 1991; Browdy et al., 1993; Primavera and Quintino, 2000). In addition, no important diminution on growth rate, deformities or serious effects on fecundity have been observed in *P. monodon* (Withyachumarnkul et al., 2006). However, the reason for such differences in signs among species is not fully understood yet.

Tissue histopathology and electron microscopy of acute and subacute organisms of the species *P. stylirostris*, *P. monodon* and *P. vannamei* have shown large Cowdry type A intranuclear inclusions in gills, nerve cord, stomach mucosa, antennal gland, cuticular hypodermis, haematopoietic and connective tissues (Lightner et al., 1983a; Bell and Lightner, 1984). *Penaeus stylirostris* presented a higher degree of tissue damage in the gills, nerve cord ganglia compared with *P. vannamei*. The damage provoked by such histopathology may be the cause for the characteristic clinical signs observed in IHNV-infected shrimp (Bell and Lightner, 1984).

It is worth mentioning that there is currently no effective strategy to treat or prevent the occurrence or spread of this virus, and only few studies have been conducted to evaluate the potential antiviral strategies against IHNV. Thus, a recent report revealed that the introduction of dsRNAi corresponding to the IHNV capsid protein (CP) in experimentally infected house crickets (*Acheta domesticus*) was effective in reducing viral replication, and it was suggested that the administration of IHNV-specific dsRNAs may provide a potent strategy for an effective treatment against this virus in crustaceans (La Fauce and Owens, 2009).

After the discovery of IHNV in Hawaii, this virus was found to be widely distributed in cultured shrimp in North, South, Central America, the Caribbean and the Indo-Pacific. In the Gulf of California, México, this virus was detected in shrimp farms where the blue shrimp (*P. stylirostris*) was cultivated (Lightner, 1992; Lightner et al., 1992). Furthermore, in a survey study performed in two stations in the Northern part of the Gulf of California, a high prevalence of this virus was found in wild adult females (86% and 89%) and males (56% and 57%) of *P. stylirostris* (Morales-Covarrubias et al., 1999). On the contrary, recent reports have shown that the prevalence of IHNV in wild shrimp *P. setiferus* (white shrimp) and *P. aztecus* (brown shrimp) from the estuary of La Pesca in La Laguna Madre Tamaulipas, México, is low (only 4.4%) (Guzmán-Sáenz et al., 2009).

High prevalence of IHNV has been also recently reported in other regions of the world, such as China. Hence, during 2001–2004, by means of PCR diagnosis, prevalences of 51.5% and 8.3% were detected in shrimp and crabs, respectively (Yang et al., 2007). The virus has also been detected in both coasts of India, causing slow growth in *P. monodon*. The phylogenetic analysis of several DNA sequences shows that the Indian IHNV isolate is closely related to an isolate from South-East Asia, which suggests that the entry of the virus reached India from South-East Asia (Rai et al., 2009). In addition, because of its geographical isolation and a strict quarantine policy avoiding the importation of live prawns into

the country, Australia was supposed to be free of this virus. However, some reports detected the occurrence of this virus in Australia since 1992 (Owens et al., 1992) to date (Saksmerprom et al., 2010). Furthermore, culture facilities of penaeid shrimp in SE Asia using exclusively wild broodstock were infected with IHHNV (Lightner et al., 1990). Taken together, these observations suggest that the West Pacific may be the original geographical source for IHHNV (Owens et al., 1992). Table 1 presents a list of countries in which IHHNV has been isolated or detected.

Virus Taxonomy and Structure

Based upon its morphological characteristics (the smallest of the known penaeid shrimp viruses, with a diameter of 22 nm non-enveloped particles, with an isometric icosahedral shape), its buoyant density in CsCl (1.40 g/ml) and its genome size (single-stranded DNA with a size of 3.9 kb) (Lightner, 2011), the IHHNV has been classified as a member of the family Parvoviridae (Mathews, 1982). The capsid of the virus is composed of four polypeptides with 74, 47, 39, and 37.5 kDa (Bonami et al., 1990). Despite its geographical origin, a total of three large and partially overlapping open reading frames (ORFs) have been identified in all isolates (Shike et al., 2000). Furthermore, the overall genomic organization is similar to that of the mosquito brevidensoviruses, and it has therefore

been proposed that the term IHHNV is inappropriate and suggested that this virus should be renamed *Penaeus stylirostris* densovirus (*Pst*DNV) (Shike et al., 2000).

Interestingly, the full-length IHHNV CP was recombinantly expressed in *Escherichia coli* with a His-tag at its N terminus, and it was found that it can spontaneously self-assemble, without involvement of intramolecular disulphide bonds, into virus-like particles (VLPs) with homogeneous size and appearance similar to those observed in native IHHNV particles. Furthermore, it was found that the recombinant IHHNV-VLPs are able to encapsidate substantial amounts of nucleic acids with a predominant size of 0.5 kb, mainly RNA (Hou et al., 2009).

Transmission and Host Range

It is now widely accepted that the transmission of IHHNV within a penaeid shrimp population may occur whether horizontally (transmitted among individuals of the same generation by direct contact, or indirectly, by ingestion of infected organisms) or vertically (the virus is passed from an infected female parent to her F1 progeny) (Lightner et al., 1983a,b; Motte et al., 2003). Several reports regarding successful horizontal transmission by ingestion of IHHNV-infected shrimp tissue have been published (Bell and Lightner, 1987; Tang and Lightner, 2006; Coelho et al., 2009). On the other hand, even if vertical transmission of the virus was suspected (Lotz,

Table 1. The geographical distribution of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus isolates

Continent	Country	References
America	Argentina	Martorelli et al., 2010;
	Peru	Alfaro-Aguilera et al., 2010;
	Brazil	Dos Santos-Braz et al., 2009; Coelho et al., 2009
	Venezuela	Boada et al., 2008
	Colombia	Tang et al., 2003
	Mexico	Unzueta-Bustamante et al., 1998; Nunan et al., 2000; Tang and Lightner, 2001; Guzmán-Sáenz et al., 2009
	Ecuador	Jimenez et al., 1999; Nunan et al., 2000
	USA (HI, TX and CA)	Kalagayan et al., 1991; Owens et al., 1992; Nunan et al., 2000; Shike et al., 2000; Tang et al., 2007
	Panama	Nunan et al., 2000; Tang and Lightner, 2001
Belize	Tang et al., 2007	
Asia	China	Yang et al., 2007; Zhang et al., 2007
	India	Rai et al., 2009
	Philippines	Belak et al., 1998; Nunan et al., 2000; Tang et al., 2003, 2007
	Thailand	Chayaburakul et al., 2004; Tang et al., 2003, 2007
	Taiwan	Tang et al., 2003
Brunei Darussalam	Claydon et al., 2010	
Oceania	Australia	Krabsetsvet et al., 2004; Saksmerprom et al., 2010
Africa	Madagascar	Tang et al., 2003; Tang and Lightner, 2006
	Mozambique	Tang and Lightner, 2006
	Tanzania	Tang et al., 2003; Tang and Lightner, 2006
	Mauritius	Tang et al., 2003

1997), it was just recently demonstrated that IHNV was detected, by dot-blot and nested-PCR, in the ovaries of infected females whereas sperm from infected males was generally free of virus. Furthermore, a negative impact of this mode of transmission was subsequently found as nauplius productivity of IHNV-free females was higher (102 000 naupli produced by spawning) than that observed for IHNV-infected females (99 000 naupli produced by spawning) (Motte et al., 2003). Another interesting observation worth noting here is that when healthy shrimp were experimentally infected with IHNV, those with a larger size showed a significantly lower prevalence of inclusion bodies and associated histopathology than smaller organisms; this may be related to the increased ability of the immune system of mature shrimp to defend against this virus, which may not be so developed on younger organisms. Other results have shown that a larger population of *P. stylirostris* (in terms of average weight) will show a less acute manifestation of the disease within a given time when compared to groups with organisms having smaller average sizes (Bell and Lightner, 1987).

Compared to the white spot syndrome virus (WSSV), which is capable to infect more than 80 crustacean species, either naturally or experimentally (Sánchez-Paz, 2010), IHNV has been detected in only a few marine crustaceans (Table 2). Knowledge of the host range of this virus is important as it may help to prevent or restrict its spread and could help to evaluate the potential damage to wild populations. Thus, it has been reported that most penaeid species can be infected with IHNV, and to date, several penaeid species have been reported as host or potential carriers of IHNV either from culture facilities, wild populations or from experimental infection. As previously mentioned, the virus has been detected in *P. stylirostris*, *P. vannamei* and *P. monodon*. Recent reports have

shown that the brown shrimp (*P. subtilis*) is susceptible to be experimentally infected but none of the clinical signs characteristic of the disease were observed on the IHNV-infected organisms (Coelho et al., 2009). The virus has also been detected, with low prevalences (4.4%) in two other penaeid species (*P. aztecus* and *P. setiferus*) sampled on the East Coast of México (Guzmán-Sáenz et al., 2009), and, as on *P. subtilis*, no clinical signs of the disease were evident. In addition, this virus has also been detected, by PCR assays and DIG-labelled probes, in non-penaeid prawn species as in post-larvae and subadults of *Macrobrachium rosenbergii*, where it caused high mortalities and deformities similar to those of RDS described in *P. stylirostris*, *P. vannamei* and *P. monodon* (Hsieh et al., 2006). Recent reports indicate the occurrence of IHNV in three different crustacean species (*Artemesia longinaris*, *Cyrtograpsus angulatus*, and *Palaemon macrrodactylus*) with high prevalences (56%, 67% and 40%, respectively) in the Bahía Blanca Estuary in Argentina (Martorelli et al., 2010), while in Perú it was detected with very low prevalence (0.31%) in *P. vannamei* (Alfaro-Aguilera et al., 2010).

Virulence

It is important to emphasize that IHNV is a highly lethal agent in at least one species of penaeid shrimp, *P. stylirostris*, causing high mortalities (~50%) within 14 days of appearance of gross signs of the disease, and by the time the disease had run its course the mortalities increased to 80–90% (Lightner et al., 1983a). Not only high mortalities caused by this virus have been observed, but unexpectedly high prevalences in wild shrimp populations have also been reported. By means of a histopathological survey, high prevalences (46–26%) were found in the Gulf of California in specimens of *P. stylirostris*, *P. californiensis* and

Table 2. Known host species reported to be naturally or experimentally infected with IHNV. Species names are in accordance to the taxonomic scheme of Holthuis (1980)

Phylum	Order	Family	Species	References
Arthropoda	Decapoda	Penaeidae	<i>Penaeus stylirostris</i>	Lightner et al., 1983b; Bell and Lightner, 1984
			<i>P. vannamei</i>	Lightner et al., 1983b; Bell and Lightner, 1984
			<i>P. monodon</i>	Primavera and Quintio, 2000
			<i>P. setiferus</i>	Guzmán-Sáenz et al., 2009
			<i>P. japonicus</i>	Tang et al., 2007
			<i>P. californiensis</i>	Robles-Sikisaka et al., 2010
			<i>P. subtilis</i>	Coelho et al., 2009
			<i>P. aztecus</i>	Guzmán-Sáenz et al., 2009
			<i>Artemesia longinaris</i>	Martorelli et al., 2010
			<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Hsieh et al., 2006
Arthropoda	Decapoda	Palaemonidae	<i>Palaemon macrrodactylus</i>	Martorelli et al., 2010
			<i>Cyrtograpsus angulatus</i>	Martorelli et al., 2010

P. vannamei (Pantoja et al., 1999). Furthermore, a high prevalence of IHNV (49%) was found in wild parent stocks of *P. stylirostris*, in a shrimp aquaculture facility in Guaymas Bay, Sonora, Mexico. Analysis of sex-related prevalence showed that males were significantly more likely to be infected with IHNV (54%) than females (44%) (Unzueta-Bustamante et al., 1998).

Recent reports have shown low prevalences (10%) of juvenile specimens of the brown shrimp (*P. subtilis*) after peroral infection with IHNV, while the rest of the organisms were asymptomatic to IHNV and no histological evidence of infection was observed (Coelho et al., 2009). However, high mortalities, fluctuating among 80–100%, were recorded in post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii* in southern Taiwan, while in subadults no mortalities were observed, but survivors were affected by growth retardation and deformities similar to those found in *P. monodon*, *P. vannamei* and *P. stylirostris* infected with IHNV (Hsieh et al., 2006).

IHNV Genome

The study of viral genomes is particularly important as it encodes multiple elements required for genome packaging, as well as proteins that interact with components of the host cell, ensure its replication and modulate host defences. To date, the complete genome of 15 different IHNV isolates have been sequenced and characterized in detail. The complete genome of IHNV ranges from 2.9 nucleotides (nt) (an East African isolate, GenBank accession number: AY124937) to 4.6 nt (GenBank accession number: DQ228538). The single-stranded DNA viral genome is composed by 20.68% of A, 19.00% C, 24.04% G and 36.28% T. Thus, the A + T content is 56.96% and the G + C content is 43.04%.

As previously mentioned, the genome is composed by three large ORFs – the left ORF, 2001 nt; the right ORF, 990 nt; and the middle ORF, 1092 nt – and a potential domain of 704 nt, referred as small ORF, is present on the minus strand (Fig. 1). The left ORF is located at the position 313–2596 nt and comprises nearly 50% of the genome (Tang et al., 2003). It contains an ATG triplet at

position 599 nt and possesses some features following agreement with the perfect consensus Kozak rule (Kozak, 1986) that modulates translation in eukaryotes (Dhar et al., 2010). If this consensus sequence is functional, the left ORF may encode a polypeptide of 666 amino acids (aa) with a molecular mass of 75.77 kDa, which is highly homologous to a major non-structural protein (NS-1) of mosquito brevidensovirus. This putative protein contains two regions resembling conserved motifs for both a replication initiator motif and a NTP-binding and helicase domains. Both motifs are highly similar to those found among the *Parvoviridae*. Because of these characteristics, it has been proposed that the left ORF may encode the major non-structural protein (NS-1) (Shike et al., 2000), which, in vertebrate infecting parvoviruses, has a pleiotropic function as it participates on DNA replication, DNA packaging, enhancement of capsid gene expression, cytotoxicity and several other functions (Doerig et al., 1990; Wilson et al., 1991; Nathalie et al., 1993; Momoeda et al., 1994; Cotmore and Tattersall, 2007a).

Furthermore, the middle ORF, located entirely within the left ORF (Dhar et al., 2010), but in a different reading frame, begins at position 534 nt and is terminated by a TAG codon at position 1631 nt. This ORF contains an in-frame ATG codon located at position 543 nt, slightly deviated from the Kozak consensus rule, which if functional may participate to encode a non-structural protein (NS-2) of 363 aa with a molecular mass of 42.11 kDa, whose function, as with other parvoviruses, is presently unknown (Shike et al., 2000).

The right ORF consists of 990 nt, starts at 2535 nt and terminates at 3527 nt. Thus, the left and the right ORFs overlap by 62 nt in their 3' and 5' terminal ends, respectively. As previously mentioned, this ORF, which is in the same reading frame as the middle ORF, contains an ATG codon slightly deviated from the characteristics of the Kozak consensus rule (Dhar et al., 2010). In accordance with this, the right ORF may encode a protein of 329 aa with a molecular mass of 37.48 kDa. By analogy to the right ORF sequence from other parvoviruses, it seems likely that the IHNV right ORF may encode the CP (Shike et al., 2000). However, it must be noticed that there

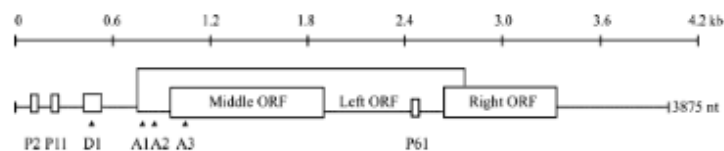


Fig. 1. Schematic representation of the genome organization of IHNV (according to the sequence submitted to GenBank, accession number AF273215, by Shike et al., 2000). The three open reading frames (ORFs; left ORF, middle ORF and right ORF) are indicated by boxes. The predicted donor (D1) and acceptors (A1, A2 and A3) sites are represented by black triangles. The locations of the promoters (P2, P11 and P61) are represented by thin boxes. Modified from: Dhar et al., 2010.

is striking incompatibility among the protein composition of the IHNV capsid (aforementioned) and the size of the viral genome.

In addition to the three previously described ORFs, the IHNV genome contains a small ORF upstream of the left ORF. This ORF contains a putative alternative 5' splice junction site (donor site, D1) and three putative alternative 3' splice junction sites (acceptor sites, A1, A2 and A3), which when working together generate different mature transcripts. These alternative splice junctions are located upstream of the left ORF (Shike et al., 2000; Dhar et al., 2010).

Finally, different transcription mapping essays revealed the existence of three transcription promoters referred as P2 (20–110 nt), P11 (located on the genomic region 180–540 nt) and P61 (2347–2512 nt; Fig. 1). P2 drives the expression of the NS-1 gene, P11 drives the transcription of the middle ORF, whereas P61 drives the expression of the structural gene (Shike et al., 2000; Dhar et al., 2007, 2010). It was further demonstrated, by means of a luciferase activity assay, that P2 had a promoter activity 3.7-fold higher than that of P11 and over 5-fold higher than that of P61 promoter, while the activity of P11 was 1.4-fold higher than that of the P61 promoter (Dhar et al., 2010).

Genetic diversity

Several studies have shown that the study of genetic diversity of viruses is particularly important as it may shed light to understand its pathogenesis and tropism, and consequently, it may help to design antiviral strategies. Few years after its discovery in Hawaii, a study determined the degree of genetic diversity among 14 IHNV isolates of the IHNV from cultured shrimp stocks sampled in six different countries of the Americas during 15 years (1982–1997) (Tang and Lightner, 2002). Based on a sequence analysis of a 2.9-kb fragment of the IHNV genome, containing the left, middle and right ORFs, low sequence variations among isolates were observed, indicating a notable stability of its genome over such period. Such stability may be due to the development of a more balanced host–pathogen relationship (Tang and Lightner, 2002). Unfortunately, current levels of genetic diversity, in terms of the underlying evolutionary process (mutation, genetic drift, gene flow and natural selection) were not quantitatively measured (Robles-Sikisaka et al., 2010). Furthermore, while nucleotide substitutions were detected, no deletions or insertions were found. Fifteen nt substitutions resulted in aa changes (7 in left ORF, 1 in middle ORF and 7 in right ORF), but no correlation was found among such substitutions and virulence (Tang and Lightner, 2002). Subsequently, a similar study including samples from the South-East Asia

region (Philippines, Thailand, and Taiwan) and from Africa (Tanzania, Madagascar and Mauritius) showed a high nucleotide sequence identity (99.8%) among the Philippine and the Hawaii isolates, which, according to the authors, supports the assumption that the IHNV was introduced to Hawaii with infected *P. monodon* stocks from Philippines, and it seems probable that it spread from here to other countries in the Americas (Tang et al., 2003). Recently, two different IHNV genetic variants have been reported to occur in Australia. A non-infectious form of IHNV (type A) was detected in *P. monodon* samples (Krabsetsve et al., 2004; Tang and Lightner, 2006), and an infectious type of IHNV identified in samples from farmed *P. monodon*. (Saksmerprom et al., 2010). Interestingly, it was found that the DNA sequence of the non-infectious form (types A and B) is integrated in the genome of the shrimp (Tang and Lightner, 2006). The integration of a parvovirus into the host genome is not unusual, and has been reported in a number of species (Berns and Linden, 1995), and may be a consequence of inverted terminal repeats present in the genome that may facilitate their integration in host DNA (Yang et al., 1997).

Recently, a Bayesian coalescent approach, used to analyse the DNA sequence encoding the CP from 89 shrimp samples obtained from the Gulf of California, showed an unexpectedly high mean rate of nucleotide substitution for IHNV (1.39×10^{-4} substitutions/site/year), comparable to that reported for RNA viruses (Robles-Sikisaka et al., 2010). Furthermore, the levels of haplotype and nucleotide diversity were almost five times higher than those previously reported by Tang et al. (2003) for IHNV isolates from the Gulf of California. Furthermore, it was also reported that the IHNV genetic diversity across geographical regions in the north-western coast of Mexico is not uniform, reaching more variability (almost an order of magnitude) in those samples obtained from localities in the central and southern regions of the Gulf of California than those in the northern region (Robles-Sikisaka et al., 2010).

Molecular Mechanism of Infection

Despite the recognized lethal impact that IHNV can exert on the dynamics of natural and cultured populations of shrimp, the precise molecular mechanisms of infection have not yet been elucidated. Little is really known about the process of IHNV infection, because of the lack of an established shrimp cell line. Even when the members of the Parvoviridae family show a wide variety of mechanisms of infection, some unique characteristics are commonly shared.

The parvovirus viral infection process comprises four stages: binding to the cell surface receptors, internaliza-

tion via endocytosis, escape from endocytic vesicles and nuclear delivery (Mudhakar and Harashima, 2009). A wide variety of glycoproteins, glucans and glycolipids have been described as vertebrate parvovirus receptors, such as transferrin receptor, sialic acid, heparan sulphate proteoglycan, $\alpha V\beta 5$ integrin (Vihinen-Ranta et al., 2004; Mudhakar and Harashima, 2009). However, and despite several years of research, the receptors associated with IHNV have not been yet identified.

Subsequently, to the virus–cell interaction, the endocytic process is carried out in several types of virus including parvoviruses (Vendeville et al., 2009; Cohen et al., 2010). Diverse endocytic mechanisms have been described: clathrin-mediated endocytosis, caveolar endocytosis, and clathrin- and caveolae-independent endocytosis (Mudhakar and Harashima, 2009). Although in IHNV the endocytic process is not reported, it is known that most of the members of the family *Parvoviridae* need receptor-mediated endocytosis for cellular uptake. Furthermore, many studies have shown that in some parvoviruses, including the *Junonia coenia* densovirus (JcDNV), are entered to the cell via the clathrin-dependent endocytic pathway (Vihinen-Ranta et al., 2004; Harbison et al., 2008; Vendeville et al., 2009).

After endocytosis, viral particles are found in endosomal compartments in some intracellular locations and are further transported and released in the cytosol. However, determining how vesicle traffic is carried out through the cytoplasm is a complex task (Cotmore and Tattersall, 2007b; Harbison et al., 2008; Vendeville et al., 2009). It has been found that endosomal acidification is essential for infection and might induce conformational changes in the capsid. Some studies show that phospholipase A2 (PLA2) associated with VP1 seems to be directly or indirectly responsible for viral particles that escape from late endosome to the cytoplasm; this plays an important function in parvoviral host cell infection (Vendeville et al., 2009; Harbison et al., 2008; Cohen et al., 2010). There are two possible strategies for the escape of viral particles from the endosomes to follow their pathway to the nucleus: membrane disruption via carpet-like mechanism (detergent-like) and transmembrane pore formation via a barrel-stave mechanism. The second mechanism is reported in canine parvovirus (CPV), which is triggered by low pH condition arising from PLA2 activity (Mudhakar and Harashima, 2009). However, recent studies have proposed that IHNV has only one type of CP that lacks the PLA2 activity (Kaufmann et al., 2010).

Once released from vesicles, particles need to be transported to the nucleus by dynein through microtubules to replicate using the cellular machinery. It has been suggested that the nuclear pore complex (NPC) might allow passing intact viral particles from 26 nm approximately.

Because of the diameter of the IHNV particle (22 nm), it seems feasible that it may pass intact through the NPC. However, some studies have shown that despite the nuclear localization signal (NLS) sequences in the N terminus of VP1 exposed during entry, the viruses might not enter to the NPC (Harbison et al., 2008); however, some studies explain that parvoviruses disrupt the nuclear envelope and nuclear lamina and enter the nucleus through the resulting gaps (Cohen et al., 2010).

Once parvoviruses entered to the nucleus, it is necessary to wait for the cell to enter S-phase to carry out viral DNA replication (Cotmore and Tattersall, 2007b; Harbison et al., 2008). Replication is achieved by the host cell DNA polymerase, a phenomenon that occurs as all densoviruses have terminal hairpins at the 3'-ends of both complementary strands, which allows the extension of these primer sequences (Bergoin and Tijssen, 2000).

Finally, host death is a consequence of the disease caused, directly or not, by virus multiplication (Mutuel et al., 2010). A recent report indicates that in the noctuid pest (*Spodoptera frugiperda*) infected by a densovirus (JcDNV) occurs an impairment of the delivery of oxygen delivery to the demanding tissues, as a result of functional and structural alterations in the tracheae, and that mortality of infected larvae was caused by several physiological shocks, including moulting arrest and anoxia (Mutuel et al., 2010). However, whether similar events occur in crustaceans remains to be elucidated.

Concluding Remarks

The IHNV is highly contagious to several penaeid species, and it is usually fatal for *P. stylirostris*, causing significant losses for shrimp farmers. In addition to the high mortalities associated with this virus, IHNV causes abnormal physical defects, often resulting in permanent slow growth, small size, and deformities of the rostrum, antenna, thoracic and abdominal areas. Despite its social and economic significance, several important issues related to the infection, propagation, and interaction between IHNV and its hosts at the cellular and molecular level still remain to be elucidated. As previous studies have shown high prevalences of the virus in the past, it is clear that further studies are needed to evaluate the current impact caused by IHNV on wild populations of crustaceans. Thus, the development of robust detection methods and studies on the ecology of IHNV in wild populations should be a priority; otherwise, a complete evaluation of the potential risk as a result of direct or indirect exposure of wild organisms to this virus will be impractical.

It is undeniable that our knowledge about this viral disease has vastly increased in recent years, and we now

realize the necessity to fully understand all aspects of the infection process of this virus to develop future strategies to avoid the deleterious impact of the virus. However, it remains difficult to have a complete understanding of this phenomenon, because serious limitations set the direction of the research. Of course, a broad-based perspective of the subject, analysing several issues (including immune evasion and host immune response), will shed light on the possible effective strategies to overcome this important viral infection. Thus, it is surprising the scarcity of studies related to IHNV prevention and control, which should be considered as essential by those involved in this economic activity and the scientific community.

Furthermore, there is a need to comprehensively understand and delineate the basic molecular events occurring during viral pathogenesis. Such knowledge will provide means to prevent and control this viral disease. Also, the necessity to understand the ecology and epidemiology of this disease, unfortunately unknown so far, is evident. The integration of this information may help to limit the sources of infection and dispersal of the virus.

Acknowledgements

This work was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) for grant 102744 (to ASP). SVH received financial assistance for a PhD grant from CONACYT (grant 210036). Thanks are also due to the supportive assistance of the Laboratorio de Sanidad Acuicola (CIBNOR, Hermosillo) particularly to Daniel Coronado Molina, Trinidad Encinas and Diego Alberto Galván Álvarez. Thanks are given to Maria Esther Ojeda Castro and Dr. Adriana Muhlia Almazán for their valuable contributions.

References

- Alfaro-Aguilera, R., M. Guevara-Torres, and I. González-Chávez, 2010: Prevalence and distribution of the principal etiologic agents that affecting wild shrimp from Tumbes, Peru. *Rev. Peru. Biol.* 17, 359–364.
- Belak, J., A. K. Dhar, J. H. Primavera, L. D. de la Peña, P. Pettit, and A. Alcivar-Warren, 1998: Prevalence of viral diseases (IHNV and WSSV) In: *Penaeus monodon from the Philippines and its Association with Mangrove Status and Shrimp Culture Systems*. Symposium on Aquaculture and Conservation of Marine Shrimp Biodiversity, pp. 18. Tufts University School of Veterinary Medicine, Massachusetts, USA, 10 December 1998.
- Bell, T. A., and D. V. Lightner, 1984: IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 38, 185–194.
- Bell, T. A., and D. V. Lightner, 1987: IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.* 10, 165–170.
- Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Brathak, and M. Heldal, 1989: High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340, 467–468.
- Bergoin, M., and P. Tijssen, 2000: Molecular biology of densovirinae. In: Faisst, S., and J. Rommelaere (eds), *Parvoviruses. From Molecular Biology to Pathology and Therapeutic Uses*. *Contrib. Microbiol.* Karger, Basel, 4, 12–32.
- Berns, K. I., and R. M. Linden, 1995: The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17, 237–245.
- Boada, M., M. de Donato, and H. Rodulfo, 2008: Detection of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in asymptomatic cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 18, 7–11.
- Bonami, J. R., B. Trümper, J. Mari, M. Brehelin, and D. V. Lightner, 1990: Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.* 71, 2657–2664.
- Breitbart, M., L. R. Thompson, C. A. Suttle, and M. B. Sullivan, 2007: Exploring the vast diversity of marine viruses. *Oceanography* 20, 135–139.
- Browdy, C. L., J. D. Holloway, C. O. King, A. D. Stokes, J. S. Hopkins, and P. A. Sandifer, 1993: IHNV virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crustacean Biol.* 13, 87–94.
- Chamberlain, G. W., 1994: Taura syndrome and China collapse caused by new shrimp viruses. *World Aquac.* 25, 22–25.
- Chayaburakul, K., G. Nash, P. Pratanpipat, S. Sriurairatana, and B. Withyachumnarnkul, 2004: Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 60, 89–96.
- Claydon, K., R. A. Haji-Tajir, H. M. Said, M. H. Lakim, and W. Tamat, 2010: Prevalence of shrimp viruses in wild *Penaeus monodon* from Brunei Darussalam. *Aquaculture* 308, 71–74.
- Coelho, M. G. L., A. C. G. Silva, C. M. V. Vila Nova, J. M. O. Neto, A. C. N. Lima, R. G. Feijo, D. F. Apolinario, R. Maggioni, and T. C. V. Gesteira, 2009: Susceptibility of the wild southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV) and infectious myonecrosis (IMN). *Aquaculture* 294, 1–4.
- Cohen, S., S. Au, and N. Panté, 2010: How viruses access to the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta*. doi:10.1016/j.bbamer.2010.12.009.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall, 2007a: Structure and organization of the viral genome. In: Kerr, J. R., S. F. Cotmore, M. E. Bloom, and R. M. Linden (eds), *The Parvoviruses*, pp. 74–94. Hodder Arnold, London, UK.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall, 2007b: Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv. Virus Res.* 70, 183–225.
- Cowdry, E. V., 1934: The problem of intranuclear inclusions in virus diseases. *Arch. Pathol.* 18, 527–542.

- Dhar, A. K., D. K. Lakshman, S. Natarajan, F. C. T. Allnut, and N. A. M. Van Beek, 2007: Functional characterization of putative promoter elements from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimp and in insect and fish cell lines. *Virus Res.* 127, 1–8.
- Dhar, A. K., K. N. Kaizer, and D. K. Lakshman, 2010: Transcriptional analysis of *Penaeus stylirostris* densovirus genes. *Virology* 402, 112–120.
- Doerig, C., B. Hirt, J. Antonietti, and P. Beard, 1990: Non-structural proteins of parvovirus B19 and minute virus of mice control transcription. *J. Virol.* 64, 387–396.
- Dos Santos-Braz, R. F., C. P. Rodrigues de Oliveira da Silva, L. Garcia-Reis, P. C. Cunha-Martins, M. Pereira de Sales, and R. Vasconcelos-Meissner, 2009: Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. *Aquaculture* 288, 143–146.
- Fuhrman, J. A., 1999: Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541–548.
- Guzmán-Sáenz, F. M., Z. J. Molina-Garza, R. Pérez-Castañeda, J. C. Ibarra-Gómez, and L. Galaviz-Silva, 2009: Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y virus del síndrome de Taura (TSV) en camarón silvestre (*Farfantepenaeus aztecus* Ives, 1981 y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767) de La Laguna Madre, Golfo de México. *Biol. Mar. Ocean.* 44, 663–672.
- Harbison, C., J. Chiorini, and C. Parrish, 2008: The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.* 16, 208–214.
- Holthuis, L. B., 1980: *FAO Species Catalog, Vol. 1 – Shrimp and Prawns of the World*. FAO Fisheries Synopsis No. 125, FAO, Rome, 271 pp.
- Hou, L., H. Wu, L. Xu, and F. Yang, 2009: Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. *Arch. Virol.* 154, 547–553.
- Hsieh, C. Y., P. C. Chuang, L. C. L. Chen, C. Tu, M. S. Chien, K. C. Huang, H. F. Kao, M. C. Tung, and S. S. Tsai, 2006: Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 258, 73–79.
- Jimenez, R., R. Barniol, L. de Barniol, and M. Machuca, 1999: Infection of IHHN virus in two species of cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997–1998. *Aquac. Res.* 30, 695–705.
- JSA (Joint Subcommittee on Aquaculture) and Shrimp Virus Work Group, 1997: An evaluation of potential shrimp virus impacts on cultured shrimp and wild shrimp populations in the Gulf of Mexico and Southeastern US Atlantic Coastal Waters. A report to the Joint Subcommittee on Aquaculture (JSA). Prepared by the JSA Shrimp Virus Work Group, June 5, 1997, 43 pp.
- Kalagayan, G., D. Godin, R. Kanna, G. Hagino, J. Sweeny, J. Wyban, and J. Brock, 1991: IHHN virus as an etiological factor in runt deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.* 22, 235–243.
- Kaufmann, B., V. D. Bowman, Y. Li, J. Szelei, P. J. Waddell, P. Tijssen, and M. G. Rossmann, 2010: Structure of *Penaeus stylirostris* densovirus, a shrimp pathogen. *J. Virol.* 84, 11289–11296.
- Kozak, M., 1986: Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283–292.
- Krabsetsv, K., B. R. Cullen, and L. Owens, 2004: Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* 61, 153–158.
- La Fauce, K. A., and L. Owens, 2009: RNA interference reduces PmergDNV expression and replication in an *in vivo* cricket model. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 111–115.
- Lightner, D. V., 1992: Shrimp virus diseases: diagnosis, distribution and management. In: Wyban, J. (ed.), *Proc. Special Session on Shrimp Farming World Aquaculture Soc.*, pp. 238–253. Baton Rouge.
- Lightner, D. V., 1994: Enfermedades del camarón. In: Martínez-Córdova, L. R. (ed.), *Camaronicultura*, pp. 161–220. AGT editor, México, D.F., México.
- Lightner, D. V., 1996: Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. Sci. Tech.* 15, 579–601.
- Lightner, D. V., 2011: Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 110–130.
- Lightner, D. V., M. Redman, and A. Bell, 1983a: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 42, 62–70.
- Lightner, D. V., R. M. Redman, T. A. Bell, and J. A. Brock, 1983b: Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* imported into Hawaii. *J. World Mar. Soc.* 14, 212–225.
- Lightner, D. V., T. A. Bell, and R. M. Redman, 1990: A review of the known hosts, geographic range and current diagnostic procedures for the virus diseases of cultured penaeid shrimp. *Advances in Tropical Aquaculture, Tahiti (1989). Actes Colloq.* 9, 113–126.
- Lightner, D. V., R. Williams, T. Bell, R. M. Redman, and A. Perez, 1992: A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES J. Mar. Sci.* 194, 97–105.
- Lotz, J. M., 1997: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 405–413.
- Martorelli, S. R., R. M. Overstreet, and J. A. Jovanovich-Alvillar, 2010: First report of viral pathogens WSSV and IHHNV in Argentine crustaceans. *Bull. Mar. Sci.* 86, 117–131.
- Mathews, R. E. F., 1982: Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 17, 1–199.

- Momoeda, M., S. Wong, M. Kawase, N. S. Young, and S. Kajigaya, 1994: A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J. Virol.* 68, 8443–8446.
- Morales-Covarrubias, M. S., L. M. Nunan, D. V. Lightner, I. C. Mota-Urbina, M. C. Garza-Aguirre, and M. C. Chavez-Sanchez, 1999: Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Northern Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health* 11, 296–301.
- Motte, E., E. Yugcha, J. Luzardo, F. Castro, G. Leclercq, J. Rodriguez, P. Miranda, O. Borja, J. Serrano, M. Terreros, K. Montalvo, A. Narvaez, N. Tenorio, V. Cedeno, E. Mialhe, and V. Boulo, 2003: Prevention of IHHNV vertical transmission in the White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219, 57–70.
- Mudhakar, D., and H. Harashima, 2009: Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. *AAPS J.* 11, 65–77.
- Mutuel, D., M. Ravallec, B. Chabi, C. Multeau, J. M. Salmon, P. Fournier, and M. Ogliastro, 2010: Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in *Spodoptera frugiperda*: a route of infection that leads to hypoxia. *Virology* 403, 137–144.
- Nathalie, S., M. Frederick, A. Marc, and H. Uriel, 1993: Transactivation of the long-terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 by the parvovirus B19 NS1 gene product. *J. Gen. Virol.* 74, 2011–2014.
- Nunan, L. M., B. T. Poulos, and D. V. Lightner, 2000: Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.* 2, 319–328.
- Overstreet, R. M., 1994: BP (Baculovirus penaei) in penaeid shrimps. In: "USMSFP 10th Anniversary Review," GCRL Special Publication No. 1, pp. 97–106.
- Owens, L., I. G. Anderson, M. Kenway, L. Trott, and J. A. H. Benzie, 1992: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.* 14, 219–228.
- Pantoja, C. R., D. V. Lightner, and K. H. Holtschmit, 1999: Prevalence and geographic distribution of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health* 11, 23–34.
- Primavera, H., and E. T. Quintino, 2000: Runt deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biol.* 20, 796–802.
- Rai, P., B. Pradeep, I. Karunasagar, and I. Karunasagar, 2009: Detection of viruses in *Penaeus monodon* from India showing signs of slow growth syndrome. *Aquaculture* 289, 231–235.
- Robles-Sikisaka, R., A. J. Bohonak, L. R. McClenaghan, and A. K. Dhar, 2010: Genetic signature of rapid IHHNV (Infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus) expansion in wild *Penaeus* shrimp populations. *PLoS One* 5, e11799.
- Saksmerprom, V., O. Puiprom, C. Noonin, and T. W. Flegel, 2010: Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture* 298, 190–193.
- Sánchez-Paz, A., 2010: White spot syndrome virus an overview on an emergent concern. *Vet. Res.* 41, 43.
- Shike, H., A. K. Dhar, J. C. Burns, C. Shimizu, F. X. Jousset, K. R. Klimpel, and M. Bergoin, 2000: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevidensovirus. *Virology* 277, 167–177.
- Spencer, R., 1955: A marine bacteriophage. *Nature* 175, 690.
- Suttle, C. A., 2005: Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361.
- Suttle, C., 2007: Marine viruses: major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 801–812.
- Tang, K. F. J., and D. V. Lightner, 2001: Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.* 44, 79–85.
- Tang, K. F. J., and D. V. Lightner, 2002: Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and Americas. *Dis. Aquat. Org.* 49, 93–97.
- Tang, K. F. J., and D. V. Lightner, 2006: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.* 118, 185–191.
- Tang, K. F. J., B. T. Poulos, J. Wang, R. M. Redman, H. H. Shih, and D. V. Lightner, 2003: Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.* 53, 91–99.
- Tang, K. F. J., S. A. Navarro, and D. V. Lightner, 2007: PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 74, 165–170.
- Unzueta-Bustamante, M. L., K. H. Holtschmit, J. A. Olivas-Valdez, L. R. Martinez-Cordova, M. A. Porchas-Cornejo, and M. L. Lizarraga-Partida, 1998: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild parent stocks of blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson), in Guaymas, bay, Sonora, Mexico. *Cienc. Mar.* 24, 491–498.
- Vendeville, A., M. Ravallec, F. X. Jousset, M. Devise, D. Mutuel, M. López-Ferber, F. Fournier, T. Dupressoir, and M. Ogliastro, 2009: Densovirus infectious pathway requires clathrin-mediated endocytosis followed by trafficking to the nucleus. *J. Virol.* 83, 4678–4689.
- Vihinen-Ranta, M., S. Suikkanen, and C. Parrish, 2004: Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J. Virol.* 78, 6709–6714.
- Wilson, G. M., H. K. Gindal, D. E. Yeung, W. Chen, and C. R. Astell, 1991: Expression of minute virus of mice non-struc-

S. Vega-Heredia et al.

Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus

- tural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* 185, 90–98.
- Withyachumnarnkul, B., K. Chayaburakul, S. Lao-Aroon, P. Plodpai, K. Sritunyalucksan, and G. Nash, 2006: Low impact of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on growth and reproductive performance of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 69, 129–136.
- Yang, C. C., X. Xiao, X. Zhu, D. C. Ansardi, N. D. Epstein, M. R. Frey, A. G. Matera, and R. J. Samulski, 1997: Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* 71, 9231–9247.
- Yang, B., X. L. Song, J. Huang, C. Y. Shi, and L. Liu, 2007: Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. *Microbiology* 120, 63–70.
- Zhang, C., J. F. Yuan, and Z. L. Shi, 2007: Molecular epidemiological investigation of infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus and taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in China. *Virol. Sin.* 22, 380–388.

IV.II. Puntos clave del capítulo I

- 1.- La enfermedad que produce el IHHNV en *L. stylirostris*, es más severa en poblaciones de camarones chicos (5.0 mg a 3.7 g), que en camarones medianos-grandes (14.5 a 36.9 g).
- 2.- En *L. vannamei* la enfermedad producida por el IHHNV, no es tan mortal, sin embargo el camarón blanco manifiesta la enfermedad del RDS (Síndrome de la deformidad y enanismo).
- 3.- La transmisión del IHHNV se da de forma horizontal ó vertical.
- 4.- Los individuos de *L. stylirostris* que sobreviven al IHHNV, son portadores y transmisores de este virus de por vida, y no se manifiestan signos aparentes de la enfermedad.
- 5.- Diversas investigaciones han demostrado que existen variantes del IHHNV que no son infecciosas (variante C). Estas variantes se integran en el genoma de *P. monodon*, originario del este de África y Australia.
- 6.- Hoy en día se sabe poco acerca del proceso de infección del IHHNV, en parte porque no se puede cultivar in-vitro (a la fecha no hay líneas celulares disponibles de camarón) y por otro lado la investigación ha sido enfocada a otros patógenos de mayor distribución.

7.- El IHNV tiene una prevalencia elevada (80 al 100% en hembras y del 60% en machos) en poblaciones de camarón silvestres en el Golfo de California, consideramos que esta enfermedad amerita mayor atención de la que ha recibido.

V. Capítulo II

Detección de falsos positivos del
IHHNV en procedimientos de
diagnóstico actuales

V.I. Introducción

En los últimos años el cultivo global de camarón se ha incrementado de forma importante en cuanto a superficie cultivada y producción (FAO, 2007). Sin embargo, algunos factores han impactado seriamente el desarrollo de esta industria. Entre ellos, las enfermedades infecciosas virales han causado pérdidas económicas importantes. Uno de los agentes virales más importantes por su amplia distribución y capacidad de producir epizootias con altas mortalidades es el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV, por sus siglas en inglés). Este virus pertenece a la familia Parvoviridae y se distribuye ampliamente en camarones peneidos silvestres causando mermas a la industria acuícola en América, Australia, Oceanía y Asia (Nunan et al., 2000; Owens et al., 1992).

Los camarones peneidos presentan diferente susceptibilidad a la infección por IHHNV. Los peneidos adultos infectados con IHHNV no sufren consecuencias importantes tras la infección con este virus, ya que no presentan signos clínicos de la enfermedad, ni mortalidad. Sin embargo, algunos reportes indican que en juveniles del camarón *Penaeus stylirostris* en granjas de cultivo se han presentado altas tasas de mortalidad (~90%) (Vega Heredia et al., 2012); mientras que en organismos juveniles de *Penaeus vannamei* infectados con este virus, no ocurren tasas de mortalidad tan elevadas. Pese a esto, en esta última especie de camarón se presenta una problemática diferente: los juveniles infectados desarrollan deformidades cuticulares en diversas estructuras

anatómicas y una reducción significativa en la tasa de crecimiento, lo que se ha denominado como síndrome de deformidad y enanismo (Runt Deformity Syndrome ó RDS, por sus siglas en inglés) (Primavera y Quinito, 2000; Vega Heredia, et al., 2012). El IHHNV es más virulento en grupos de animales de tamaño pequeño (5.0 mg a 3.7 g) que en los grupos de mayor tamaño (14.5 a 36.9 g) (Bell y Lightner, 1984 y 1987). Además es importante mencionar que los organismos que sobreviven al IHHNV tienen la capacidad de convertirse en portadores y transmisores del virus de por vida, pese a que no presentan signos de la enfermedad (Bell y Lightner, 1987).

Mediante la secuenciación de genomas y análisis filogenético, diversas investigaciones han confirmado que el genoma de los parvovirus con frecuencia se endogeniza en los genomas de especies de vertebrados e invertebrados (Berns, 1990; La Fauce y Owens, 2009; Belyi et al., 2010; Liu et al., 2011). A través del análisis de secuencias se ha evidenciado la transferencia horizontal de genes del IHHNV al genoma del camarón asiático *Penaeus monodon* (Tang y Lightner, 2006; Saksmerprome et al., 2011). Los eventos de recombinación y transferencia de genes entre los virus y sus huéspedes son esenciales para la evolución de los virus en general. Debido a esto, los huéspedes del IHHNV, sufren de infección persistente o latente, sin signos evidentes de la enfermedad, además el virus es transmitido de forma horizontal a los descendientes.

Saksmerprome et al. (2011), demostraron que secuencias del genoma del IHHNV se encuentran insertadas en el genoma de *P. monodon* originario del este de África y Australia, estos insertos dan resultados falsos positivos cuando

se utilizan los métodos de diagnóstico 309F/309R y IQ2000. Sin embargo, la organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), recomienda utilizar estos métodos para la detección del IHHNV. Es importante que investigaciones futuras evalúen como se da el mecanismo de inserción de genomas virales a genomas de sus huéspedes, para entender la co-evolución entre patógeno y huésped. El objetivo del capítulo dos, es evaluar el método de diagnóstico actual para la detección del IHHNV *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*, y en base a ello comprender la co-existencia evolutiva del patógeno (IHHNV) y huésped (camarón) en la infección persistente.

Artículo 2

(sometido)

**False positive detection of IHHNV
in current diagnostic procedures**

Elsevier Editorial System(tm) for Virus Research
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: False positive detection of IHHNV in current diagnostic procedures

Article Type: Research Paper

Keywords: IHHNV, infectious, disease, shrimp, vannamei, stylirostris, PCR

Corresponding Author: Dr. Ivone Giffard-Mena, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidad Autónoma de Baja California

First Author: Sarahí Vega-Heredia, CPhD

Order of Authors: Sarahí Vega-Heredia, CPhD; Arturo Sánchez-Paz, PhD; Ivone Giffard-Mena, Ph.D.

Abstract: Shrimp and other crustaceans can take persistent viral infections without signs of disease and carry them life-long without any gross signs of disease. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis viruses (IHHNV) can become part of the genetic material of their host species. It is known that this endogenous nucleic acid contributed to the evolution of the host genome by introducing mutations that regulate host gene expression and produce a protein that can modulate the host immune response. PCR analyses were carried out with different primer sets; 77012F/77353R, 392F/R, 309F/R, MG831F/R and IHF2544/R3759, all recommended by the World Animal Health Organization (OIE) for IHHNV PCR detection. In this research, we report the occurrence of false positive results for infectious IHHNV when using the 309F/R method in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, at postlarvae, juvenile and sub adult developmental stages cultured in Mexico. *L. vannamei* and *L. stylirostris* (blue shrimp) were resistant to IHHNV experimental infection in post larvae, juvenile and adult developmental stages.



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas

<http://oceanologia.ens.uabc.mx/~igiffard/>

Carretera Tijuana-Ensenada Km 103 Apartado postal 76
Ensenada BC, CP 22860 México
Tel. +52(646) 175 07 07 ext. 64836, Fax +52(646) 174 41 03
igiffard@uabc.edu.mx



Ensenada, BC, México on September 21th, 2014.

Dennis O'Callaghan, Ph D.
Department of Microbiology and Immunology
Louisiana State University (LSU), Health Sciences Center,
1501 Kings Highway, Shreveport, LA 71130, USA
Virus Research
EDITOR

Dear Editor,

Please find herewith our manuscript on « False positive detection of IHNV in current diagnostic procedures » by Sarahí Vega-Heredia, Arturo Sánchez-Paz and Ivone Giffard-Mena. This is an original document and we should be very indebted if you could consider this article for publication in Virus Research. This document is an original research not published before.

Yours sincerely,

Atentamente,
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

Dra. Ivone Giffard Mena
Profesor/Investigador

Cuerpo Académico de Ecología Molecular

1 **False positive detection of IHNV in current diagnostic procedures**

2 Sarahí Vega-Heredia^a, Arturo Sánchez-Paz^b, Ivone
3 Giffard-Mena^{c*}
4

5 ^aPrograma de Doctorado en Ecología Molecular y Biotecnología. Facultad de Ciencias
6 Marinas. Universidad Autónoma de Baja California, Carretera Tijuana-Ensenada Km
7 103, Ensenada, 22860; Baja California, México.

8 ^bLaboratorio de Sanidad Acuícola. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
9 (CIBNOR), S.C. (Campus Hermosillo). Calle Hermosa # 101. Fraccionamiento Los
10 Ángeles. Hermosillo, Son. C.P. 83206, México.

11 ^cLaboratorio de Patología Experimental Acuícola. Facultad de Ciencias Marinas.
12 Universidad Autónoma de Baja California, Carretera Tijuana-Ensenada Km 103,
13 Ensenada, 22860; Baja California, México.

14

15 Corresponding Author: Ivone Giffard-Mena, Ph.D
16 Universidad Autónoma de Baja California
17 Laboratorio de Patología Experimental Acuícola
18 Ensenada, Baja California
19 Tel: +52 (646)175 07 07 Ext. 64836
20 Fax: +52 (646) 174 41 03
21 E-Mail: igiffard@uabc.edu.mx

22

23

24

25

Summary

26 Shrimp and other crustaceans can take persistent viral infections without signs of
27 disease and carry them life-long without any gross signs of disease. Infectious
28 hypodermal and hematopoietic necrosis viruses (IHHNV) can become part of the
29 genetic material of their host species. It is known that this endogenous nucleic acid
30 contributed to the evolution of the host genome by introducing mutations that regulate
31 host gene expression and produce a protein that can modulate the host immune
32 response. PCR analyses were carried out with different primer sets; 77012F/77353R,
33 392F/R, 309F/R, MG831F/R and IHF2544/R3759, all recommended by the World
34 Animal Health Organization (OIE) for IHHNV PCR detection. In this research, we
35 report the occurrence of false positive results for infectious IHHNV when using the
36 309F/R method in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, at postlarvae, juvenile and sub
37 adult developmental stages cultured in Mexico. *L. vannamei* and *L. stylirostris* (blue
38 shrimp) were resistant to IHHNV experimental infection in post larvae, juvenile and
39 adult developmental stages.

40

Keywords

41

IHHNV, infectious, disease, shrimp, *vannamei*, *stylirostris*, PCR

42

Abbreviations: IHHNV, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Viruses;

43

RDS, runt deformity syndrome; WSSV White Spot Syndrome Virus; iRNA,

44

interference system; RT, reverse transcriptase; IN, integrase; imRNA, immune;

45

AHPND, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease; OIE, World Animal Health

46

Organization; SPF, specific pathogen free.

48

1. Introduction

49 Based upon its characteristics, hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)
50 has been classified as a member of the family Parvoviridae. Several studies using
51 sequence and phylogenetic analysis have confirmed that parvovirus have been
52 frequently endogenized into the genomes of vertebrate and invertebrate species (Berns,
53 1990; La Fauce and Owens, 2009; Belyi et al., 2010; Liu et al., 2011). Through
54 sequence analysis and experimental verification, IHHNV horizontal gene transfer
55 (HGT), has been detected in *Litopenaeus monodon* (Tang and Lightner, 2006;
56 Saksmerprome et al., 2011). Recombination events are essential for the evolution of
57 virus in general, by this way; IHHNV is carried as persistent or latent infections in
58 infected shrimp as active infection during several generations without perceptible signs
59 of disease.

60

61 The Mexican Pacific culture of *Litopenaeus vannamei* (white shrimp) currently
62 represents more than 95% of national total shrimp production; the second place is taken
63 by *L. stylirostris* (blue shrimp). This species was affected by IHHNV at the beginning of
64 1990, which produces mortality rates of 90% in farmed juveniles and sub adults of *L.*
65 *stylirostris*. This virus spread out of the farms impacting economy significantly, causing
66 mass mortality and fall down the wild fishery of *L. stylirostris* in Mexican coasts.
67 IHHNV infection in *L. vannamei* is associated with runt deformity syndrome (RDS),
68 causing reduction on the growth rate and rostrum deformity (Lightner, 2011; Vega-
69 Heredia et al., 2012). Some recent reports indicate that individuals of certain
70 populations of *L. vannamei* and *L. stylirostris* were asymptomatic, but can carry the
71 virus during all their life and transmit it to their offspring as well as other arthropod
72 species by horizontal and vertical transmission (Lightner, 2011).

73

74 To date, three genetic variants of IHHNV have been reported: Type A and B, detected
75 in Americas, Philippines and South East Asia, which are infectious to *L. stylirostris*, *L.*
76 *vannamei* and *L. monodon*. The type C has been detected in East Africa, Madagascar
77 and Australia, it is not infectious to these species (they are resistant) and the virus
78 sequence has been integrated into the *P. monodon* genome (Tang et al., 2003;
79 Krabsetsve et al., 2004; Tang and Lightner, 2006). Due to the occurrence of multiple
80 geographical IHHNV variants, several PCR methods and commercial PCR kits are
81 available for its detection. However, some variants can not be detected through all
82 methods. For example some primer sets (77012F/77353R, 389F/389R and 392F/392R)
83 are useful to identify all genetic variants (Tang et al., 2000; Tang et al., 2003; Tang and
84 Lightner, 2006; Lightner, 2011), but the primers 309F/309R were specifically designed
85 to detect only the IHHNV infectious forms (Tang et al., 2007). Other primer pairs like
86 MG831F/MG831R, react with non-infectious viral variants, but also amplify fragments
87 of the *P. monodon* genome (Tang et al., 2000; Tang and Lightner, 2006; Tang et al.,
88 2007).

89

90 It has been shown that a non-infectious IHHNV viral sequences are inserted into
91 *Penaeus monodon* genome from East Africa and Australia, these inserts give false
92 positive results when using 309F/309R and IQ2000 suggested methods by the World
93 Organization for Animal Health (OIE) (Saksmerprome et al., 2011). Because of variable
94 inserts of the viral genome into the shrimp genome, the OIE and recent publications
95 (Saksmerprome et al., 2010; Saksmerprome et al., 2011) recommended detection
96 method using primers for PCR on different regions of the whole genome of IHHNV to
97 reduce the probable false positive results. False positive specimens might be damaging

98 breeding and shrimp culture programs. Therefore the aim of this study was to explore
99 the occurrence of false positive results for infectious IHHNV when using 309F/309R
100 method in *L. stylirostris* and *L. vannamei* post larva, juvenile and sub adult cultured in
101 Mexico.

102

103

2. Materials and Methods

2.1. Shrimp

104 During 2011 to 2012, *L. stylirostris* post larva (n= 300, weight 0.09g when received to -
105 2.00g at the end of the experiment) and *L. vannamei* post larva (n=1000, average 0.08g
106 when received), sub adults and juveniles (n= 500, weight 2g when received to 26g at the
107 end of the experiment) were acquired in four production farms located in Sonora
108 (Huatabampo, Kino, and Guaymas), Mexico. *L. stylirostris* post larva were provided by
109 a hatchery located in Huatabampo where they hatch from wild parent stocks caught on
110 the Pacific Coast of Sonora, Mexico (specific fishing sites are unknown). All shrimp
111 were transported to the laboratory facilities at CIBNOR-Hermosillo, and were
112 maintained in 1,000 L tanks with aerated and UV treated seawater (34 psu, 28°C) and
113 natural photoperiod. They were kept under these conditions for two to three months,
114 water was changed daily. Food with 35% protein was supplied twice a day
115 (Camaronina, Purina).

116

2.2. IHHNV PCRs

117 We analysed a sample of 586 *L. vannamei* and 70 *L. stylirostris* by PCR (pools of DNA
118 from 5 individuals at each post larva, juvenile or sub adult stage, confirmation was done
119 on individuals taken randomly). For post larva, the pleopods were dissected, but in
120 juveniles and sub adults a sample of haemolymph was taken from each organism at the
121
122

123 base of fifth pereopod with a 1 mL syringe containing two volumes of shrimp
124 anticoagulant solution (SIC-EDTA) (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM Na-EDTA, 10
125 mM HEPES, pH 7.3) (Vargas-Albores et al., 1993). We used an IHHNV inoculum
126 acquired from the laboratory of Dr. Lightner (Department of Veterinary Science and
127 Microbiology, University of Arizona) as a positive PCR control. Negative control
128 PCR's were performed with SPF (specific pathogen free) DNA samples.

129

130 DNA was isolated from pleopods or haemocytes, using the glassmilk method
131 (GeneClean Spin Kit, MP Biomedicals) according to the manufacturer instructions.
132 DNA was quantified by NanoDrop ND-8000 spectrophotometer ($A_{260\text{nm}}$). IHHNV PCR
133 detection was performed with Pure Taq Ready To Go Polymerase PCR beads (GE
134 Healthcare Company). We used the 309F/309R primers set method for detection of
135 infectious IHHNV described in OIE protocol. PCR amplification was conducted
136 following the procedure reported by Tang et al., (2007), which consisted of an initial
137 denaturation step at 95°C for 5 min, an amplification cycle of 95° C for 30 s, annealing
138 at 55° C for 30 s, and elongation at 72° C for 60 s (35x) followed by an additional
139 extension at 72° C for 7 min; this reaction gives an amplicon of 309 bp.

140

141 The OIE recommended the use of primers from different regions of the IHHNV genome
142 as a confirmatory test, since it is common to get unexpected positive or negative PCR
143 results. So, to discard the possibility of false positive results and be sure to include all
144 IHHNV genetic variants, we also ran the PCR with primers 77012F/77353R,
145 392F/392R and MG831F/MG831R which generate 356 bp, 392 bp and 831 bp
146 fragments respectively (Table 1); (Tang et al., 2000; Tang and Lightner, 2006 and Tang
147 et al., 2007). In addition to OIE's recommendation, we also follow the procedure

148 established by Saksmerprome et al. (2010), with primers IH-F2544 and IH-R3759
149 designed amplify IHHNV capsid (Right ORF) (Table 1). These primers are not
150 recommended by OIE, but distinguish infectious from non-infectious variant of IHHNV
151 and reduce the number of false positives results (Saksmerprome et al., 2011). The PCR
152 reaction was standardized as follows; Illustra Ready-To-Go PCR Beads (GE
153 Healthcare) in a 25 μ l total reaction volume containing 1 μ l of each primer (0.4 μ M), 2
154 μ l of DNA (1.6 ng/ μ L) and 21 μ L of nuclease-free water. Amplification was performed
155 with one denaturation step at 95° C during 5 min, an amplification cycle of 94° C for 30
156 s, annealing at 55 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 60 s (30x) followed by an
157 additional extension at 72 °C for 10 min; this reaction gives a 1.2 kb product.

158

159 Since in Mexico some farms presently have the White Spot Syndrome Virus (WSSV)
160 infection in *L. vannamei*, all our experimental animals were subjected to this diagnostic
161 with the WSSV Quantitative Real IQ-System kit, according to the protocol proposed by
162 the supplier (Farming IntelliGene Tech). Each amplification (12 μ L) was verified in 2 %
163 agarose gels stained with ethidium bromide. Gels were visualized under UV
164 transillumination and photographed with a digital photography system (Gel logic 100,
165 imaging system, Kodak).

166

167

168

3. Results

169 White shrimp *L. vannamei* were collected from four different farms located in Sonora
170 Mexico, they were apparently healthy organisms, without signs of RDS, IHHNV or
171 WSSV infection. However the PCR test with 309F/309R method gave IHHNV positive
172 to 264 out of 586 individuals (post larva, juvenile and sub adult) (45%) sampled for this
173 study. From the 45% positive results, we ran a confirmative PCR recommended by the

174 OIE. With primers for viral capsid (IHF2544/IHR3759, 77012F/77353R, 392F/392R
175 and MG831F/MG831R), 105 out of 264 samples (40%) PCRs were negative to
176 IHHNV. According to these results the 309F/309R method gives false positive reactions
177 in *L. vannamei* which means that only 18% (105/586) might be truly IHHNV infected
178 animals (Fig. 1 and 2). Saksmerprom et al. (2011), already reported IHHNV non-
179 infectious inserts in the *P. monodon* genome, which lead to false positive results using
180 the 309F/309R method, but this is the first report on same situation for *L. vannamei*. It
181 was noticeable that neither infected post larva or juvenile stages not presented signs of
182 RDS, this asymptomatic behaviour was already reported for this species (Vega-Heredia
183 et al., 2012). An unexpected result was the positive reaction on lane 2 in figure 1D,
184 which amplifies with 309F/309R and IHF2544/IHR3759, but was negative with
185 77012F/77353R and 392F/392R sets. This sample was processed twice giving the same
186 result.

187

188 Only one of the 586 *L. vannamei* analysed displayed external signs of IHHNV infection,
189 reduction of growth rate, rostrum deformity or cuticular malformations (Fig. 1A). When
190 DNA from this individual was analysed by PCR, it was positive for IHHNV infection
191 with primers 309F/R, 77012F/77353R, 392F/R, and IHF2544/IHR3759 (Fig. 1B, C and
192 D, line 6). Since the set of primers MG831F/MG831R can only detect the IHHNV C
193 variant (IHHNV non-infectious that been found in Africa and Australia) (Tang and
194 Lightner, 2006) there was no positive result for this individual (Fig. 1D). In our study,
195 the organisms that display genomic PCR amplifications, in both species with primers
196 309F/309R, 77012F/77353R, 392F/392R, and IHF2544/IHR3759, are organisms
197 infected with IHHNV, since those primers were designed to amplify the three ORFs of
198 the IHHNV genome (Fig. 1 and 2).

199

200 *L. stylirostris* post larva were apparently healthy during the two months that they were
201 maintained at the wet laboratory. It is notable that animals were asymptomatic and no
202 mortality from the virus was recorded after two months (Fig. 2A). 100% of the samples
203 (70/70) gave positive results with all tested primers 309F/309R, 77012F/77353R,
204 392F/392R and IHF2544/IHR3759IHHNV (Fig. 2), but no amplification was obtained
205 with the primer set MG831F/MG831R (Fig. 2) which was expected since they were
206 designed for *P. monodon* viral variant (Tang and Lightner, 2006). The explanation for
207 these positive results with all set primers without mortality indicates that *L. stylirostris*
208 might have become resistant to IHHNV infection. Double amplicons observed in
209 figures 3B and 3D could be due to low the annealing temperature in the PCR for this
210 species (since the amplification reaction was performed at the same temperature for all
211 primers) or this population might have an additional IHHNV insert. It is necessary that
212 follow up research be conducted on these results by sequencing the amplicons in order
213 to clarify this situation, but this is outside the scope of this report.

214

215

4. Discussion

216

217 Tang and Lightner, (2002) and Morales-Covarrubias, (1999), published that the low
218 variation (mutation, genetic drift) of IHHNV genomic sequence associated with reduced
219 virulence is now in equilibrium with the host. However Robles-Sikisaka, (2010), found
220 that the virus is reaching more genetic diversity because of the high evolutionary rate on
221 IHHNV, in the north-western coast of Mexico. We believe that in the most conserved
222 genes NS1 (Left ORF) and NS2 (middle ORF) there is less variability than in the gene

223 encoding the capsid (Right ORF), but somehow the virus is in equilibrium with the host.
224 Several approaches have been studied to explain this phenomenon.

225

226 It is possible that IHHNV is now integrated into the shrimp genome since some
227 vertebrate endogenous sequences which are related to the family Parvoviridae, were
228 integrated into their host genomes over the past 50 million years of evolution (Belyi et
229 al., 2010). This kind of Dependovirus AAV2 requires integration into human
230 chromosome 19 during infection. This mechanism is part of the replication strategies of
231 these viruses (Belyi et al., 2010). The transferred endogenous AAV2 sequences are able
232 to modify gene expression and promote genome evolution (Daubin and Ochman, 2004).

233

234 Another hypothesis argues that the endogenization of recent viral sequences in
235 arthropods act as a DNA memory that activates their immune system (adaptive
236 mechanism). This kind of DNA memory is heritable, so virus and arthropods co-evolve
237 as viral persistent infections in their populations (Flegel, 2009; Daubin and Ochman,
238 2004; Kazazian, 2004; Goic and Saleh, 2012). This suggests that IHHNV has co-
239 evolved with shrimp during recent generations.

240

241 Interference system (iRNA) provides cellular defence in several taxa from plants to
242 humans (Labreuche and Warr, 2012) , destroying any foreign genetic material and
243 inactivating exogenous viruses, leaving them in latency, regulating their replication
244 without causing symptoms to the host (La Fauce and Owens, 2012; Goic and Saleh,
245 2012; Labreuche and Warr, 2012). The way in which these mechanisms act in
246 crustacean genomes and other arthropods is via some enzymes such as reverse
247 transcriptase (RT) and integrase (IN), which are incorporated into the host genome

248 (Flegel, 2009). The RT enzyme identifies exotic DNA or rRNA viruses during new
249 infection events and insert cDNA sequences in their genomes. These short sequences
250 generate immune specific RNA generation mechanisms (imRNA) into the animal
251 genome and produce iRNA that can block posterior infection events (Flegel, 2009;
252 Labreuche and Warr, 2012). Animals with protective viral inserts like imRNA could
253 transmit it to their offspring (Flegel, 2009; Labreuche and Warr, 2012). To date none of
254 these hypotheses have been tested.

255

256 In the absence of immunological memory, arthropods have to survive aggressive
257 infections from persistent infections (Goic and Saleh, 2012). Through this mechanism, a
258 virus can give protection to its hosts against the same or different viruses (Daubin and
259 Ochman, 2004; Flegel, 2009; La Fauce and Owens, 2009; Goic and Saleh, 2012;
260 Labreuche and Warr, 2012). So it would be useful to investigate which of these
261 mechanisms is driving co-evolution between IHHNV and *L. vannamei* such that
262 resistance to other pathogens such as WSSV or Acute Hepatopancreatic Necrosis
263 Disease (AHPND), can be addressed.

264

265

265 **5.- Conclusion**

266

267 In this work we exposed that the 309F/309R method to detect IHHNV gave false
268 positive results when we analysed cultured populations of *L. vannamei* from the shrimp
269 farming industry in Mexico. These false positive results have possibly been leading to
270 misinterpretation diagnoses of the prevalence of this virus in some experimental studies.
271 It is important to thoroughly investigate the false positive results for positive IHHNV in
272 populations of *L. vannamei* by sequencing their genome. We recommend using primers
273 from different regions of the whole genome of IHHNV, for a diagnostic test. It's also

274 important to understand the beneficial co-existence and evolution mechanisms between
275 viruses and hosts, and this area is worthy of further research.
276

277

278 **Acknowledgements**

279 Thanks are due to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for PhD
280 grant (210036) to SVH. Our gratitude to Dr. Jorge Hernández López, Diego Alberto
281 Galvan Alvarez, Fernando Mendoza Cano, Ariadne Hernández Pérez and Summer
282 students 2012 from CIBNOR-Hermosillo. Our gratitude is also due to Sula Vanderplank
283 who helped us to improve our manuscript. We are also grateful to the shrimp culture
284 farms Camarón Dorado, La Borbolla Kino Acuícola and La Piedreña, for providing
285 facilities and animals to perform this research.

286 **References**

- 287 Belyi, V.A., Levine, A.J., Skalka, A.M., 2010. Sequences from ancestral single-stranded
288 DNA viruses in vertebrate genomes: the *Parvoviridae* and *Circoviridae* are
289 more than 40 to 50 million years old. *J.Virol.* 84, 12458-12462.
- 290 Berns, K.I., 1990. Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* 54, 316-329.
- 291 Daubin, V., Ochman, H., 2004. Start-up entities in the origin of new genes. *Curr. Opin.*
292 *Genet. Dev.* 14, 16-619.
- 293 Flegel, T.W., 2009. Hypothesis for heritable, anti-viral immunity in crustaceans and
294 insects. *Biol. Direct.* 4, 32.
- 295 Goic, B., Saleh, M.C., 2012. Living with the enemy: viral persistent infections from a
296 friendly viewpoint. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 531-537.
- 297 Kazazian, H.H., 2004. Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science* 303,
298 1626-1632.
- 299 Krabetsve, K., Cullen, B.R., Owens, L. 2004. Rediscovery of the Australian strain of
300 infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Organ.* 61,
301 153-158.
- 302 Labreuche, Y., Warr, G.W. 2012. Insights into the antiviral functions of the RNAi
303 machinery in penaeid shrimp. *Fish Shellfish Immun.* 34, 1002-1010.

- 304 La Fauce, K.A., Owens, L., 2012. RNA interference reduces PmergDNV expression
305 and replication in an in vivo cricket model. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 111-115.
- 306 Lightner, D.V., 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the
307 Americas): A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 110-130.
- 308 Liu, H., Fu, Y., Xie, J.J., Cheng, S.A., Ghabrial, G., Li, Y., Peng, Y., Yi, X., Jiang, D.,
309 2011. Widespread endogenization of Densoviruses and Parvoviruses in animal
310 and human genomes. *J. Virol.* 85, 9863-9876.
- 311 Morales-Covarrubias, M.S., Nunan, L.M., Lightner, D.V., Mota-Urbia, J.C., Garza-
312 Aguirre M.C., Chávez-Sánchez, M.C., 1999. Prevalence of infectious
313 hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild adult blue
314 shrimp *Penaeus stylirostris* from the Northern Gulf of California, Mexico. *J.*
315 *Aquat. Anim. Health*, 11, 296-301.
- 316 Robles-Sikisaka, R.A., Bohonak, J., McClenaghan Jr., L.R., Dhar, A.K., 2010. Genetic
317 signature of rapid IHHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis
318 Virus) Expansion in wild *Penaeus* shrimp populations. *PLoS ONE*, 5 (7),
319 e11799.
- 320 Saksmerprome, V., Puiprom, O., Noonin, C., Flegel, T.W., 2010. Detection of
321 infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in farmed
322 Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing.
323 *Aquaculture* 298, 190-193.
- 324 Saksmerprome, V., Jitrakorn, S., Chayaburakul, K., Laiphrom, S., Boonsua, K., Flegel,
325 T.W., 2011. Additional random, single to multiple genome fragments of
326 *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have
327 implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.* 160, 180-190.
- 328 Tang, K.F.J., Durand, S.V., White, B.L., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Lightner, D.V.,
329 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are
330 resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection.
331 *Aquaculture* 190, 203-210.
- 332 Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 2002. Low sequence variation among isolates of infectious
333 hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii
334 and the Americas. *Dis. Aquat. Org.* 49, 93-97.
- 335 Tang, K.F.J., Poulos, B.T., Wang, J., Redman, R.M., Shih, H.H., Lightner, D.V., 2003.
336 Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis

- 337 virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Organ.*
338 53, 91-99.
- 339 Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 2006. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis
340 virus (IHHNV) related sequences in the genome of the black tiger prawn
341 *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.* 118, 185-191.
- 342 Tang, K.F.J., Navarro, S.A., Lightner, D.V., 2007. PCR assay for discriminating
343 between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and
344 virus related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.*
345 74, 165-170.
- 346 Vargas-Albores, F., Guzmán, M. A., Ochoa, J.L., 1993. An anticoagulant solution for
347 haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp
348 (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Phys.* 106, 299-303.
- 349 Vega-Heredia, S., Mendoza-Cano, F., Sánchez-Paz, A., 2012. The infectious
350 hypodermal and haematopoietic necrosis virus: A brief review of what we do
351 and do not know. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 95-105.
- 352

353 **Figure & table**

354 **Table 1.** PCR primer list for IHHNV detection.

355

356 **Figure 1.** IHHNV symptoms and PCR detection in *L. vannamei* sub adult with primers
357 309F/R, 77012F/77353R, IHF2544/R3759, MG831F/R and 392F/R. (1A) Sub adult
358 with gross signs of infection as runt deformity syndrome (RDS); (1B) amplicons with
359 primers 309F/R and 77012F/77353R; (1C) amplicons with primers 392F/R; (1D)
360 amplicons with primers MG831F/R and IHF2544/IHR3759; (-) negative control or SPF
361 DNA samples; (+) positive control or IHHNV inoculums; (LD) low DNA mass ladder;
362 (1kb)1 Kb Plus DNA ladder. Note in lane 6, *L. vannamei* sub adult with signs of RDS
363 was positive with primers 309F/R, 77012F/77353R, 392F/R and IHF2544/R3759.

364

365 **Figure 2.** IHHNV PCR detection in *L. vannamei* sub adult with primers 309F/R,
366 77012F/77353R, IHF2544/R3759 and 392F/R. (1A) Shrimp with no signs of disease;
367 (2A) Amplification with primers 309F/R; (2B) amplicons with primers 77012F/77353R;
368 (2C) amplicons with primers 392F/R; (2D) amplicons with primers IHF2544/R3759; (-)
369 negative control or SPF DNA samples; (+) positive control or IHHNV inoculums; (LD)
370 low DNA mass ladder;(1kb) 1 Kb Plus DNA ladder.

371

372 **Figure 3.** IHHNV PCR detection in *L. stylirostris* post larva with primers 309F/R,
373 77012F/77353R, IHF2544/R3759 and 392F/R. DNA pools from 5 individual post larva
374 from wild parent stocks shrimp (apparently healthy organisms). (3A) Post larva of *L.*
375 *stylirostris* as apparently healthy organism; (3B) amplicons with primers 309F/R and
376 amplicons with primers 392F/R; (3C) amplicons with primers IHF2544/R3759; (3D)
377 amplicons with primers IHF2544/R3759 and 77012F/77353R; (-) negative control as

378 SPF DNA samples; (+) positive control as IHHNV inoculums; (LD) low DNA mass
 379 ladder; (1kb) 1 Kb Plus DNA ladder.

380

381 Table. 1. PCR Primer list for IHHNV detection.

Primer name	Fragment size (bp)	Sequence	Reference
77012F	356	5'-ATCGGTGCACTACTCGGA-3'	Lightner, 2011
77353R		5'-TCGTACTGGCTGTTTCATC-3'	
309F	309	5'-TCCAACACTTAGTCAAAACCAA-3'	Tang et al., 2007
309R		5'-TGCTGCTACGATGATTATCCA-3'	
392F	392	5'-GGGCGAACCAGAATCACTTA-3'	Tang et al., 2000
392R		5'-ATCCGGAGGAATCTGATGTG-3'	
MG831F	831	5'-TTGGGGATGCAGCAATATCT-3'	Tang and Lightner, 2006
MG831R		5'-GTCCATCCACTGATCGGACT-3'	
IH-F2544	1200	5'-TGCGCCGATTCAACAAGAGC-3'	Saksmerprome et al., 2010
IH-R3759		5'-GACTCTAAATGACTGACTGACG-3'	

382

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

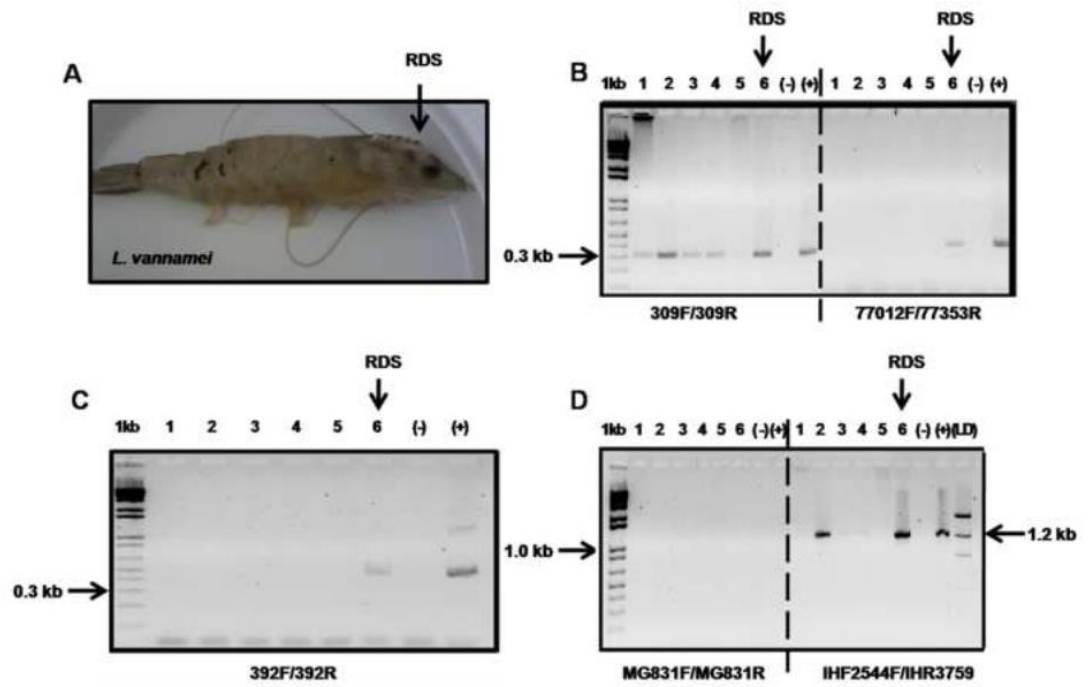


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

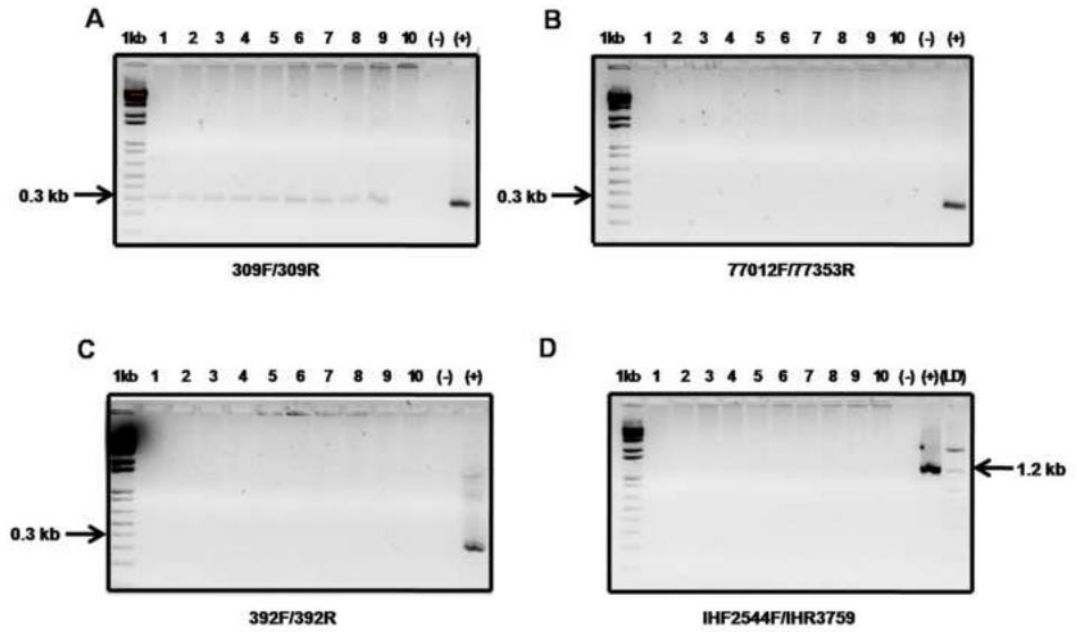
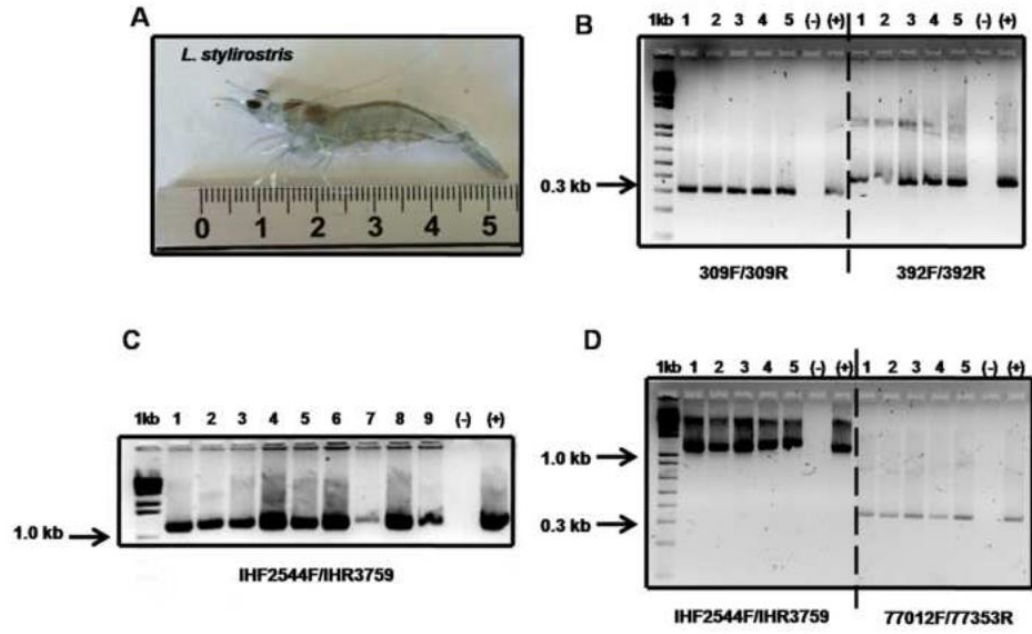


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)



V.II. Puntos clave del capítulo II

- 1.- Los crustáceos pueden tener infecciones virales persistentes sin síntomas de enfermedad.
- 2.- El genoma o segmentos del genoma del IHHNV se integran y forman parte del material genético de sus huéspedes.
- 3.- Se presentan falsos positivos al diagnosticar el IHHNV con los primers 309 F/R en *L. vannamei*.
- 4.-El mejor set de primers para diagnosticar camarones infectados con IHHNV en *L. vannamei* y *L. stylirostris*, son los primers de la cápside del IHHNV (IHF2544F/IHR3759).
- 5.- Los decápodos *L. vannamei* y *L. stylirostris* son resistentes a infecciones experimentales con IHHNV.

VI. Capítulo III

Evolución molecular de la
hemaglutinina del virus de influenza
A (H1N1) en México durante
2009 - 2012

(Artículo en preparación)

Vega Heredia S., Flores-López C., Giffard-Mena I. Robles-Sikisaka R.*

VI.1. Introducción

VI.1.1. Clasificación y nomenclatura de la familia Orthomyxoviridae

El virus de la influenza se clasifica en la familia Orthomyxoviridae, y se divide en cuatro géneros o subtipos virales influenza A, influenza B, influenza C y Thogotovirus (Lamb y Krug, 2001). Son virus de polaridad negativa (polaridad inversa al mRNA), lo que significa que el virus debe convertirse a RNA de sentido positivo por la RNA polimerasa para ser infectivo. Esta característica viral favorece altas tasas de mutación, debido a que las RNA polimerasas carecen de capacidad correctiva. El tamaño del genoma es de 12000 a 15000 nucleótidos (nt), y los distintos segmentos de RNA difieren en su tamaño (Hay, 1998). El virus de la influenza se clasifica en subtipos debido a que las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) determinan el alto grado de variabilidad antigénica, por lo que se utilizan para clasificar a los virus cuando aparecen nuevas variantes. Estudios filogenéticos han descrito que únicamente el subtipo A es el responsable de los 17 subtipos de HA denominados (H1-H17), y nueve subtipos de NA (N1-N9) (Laver et al., 1984; Cheung y Poon, 2007; Tong et al., 2012). Solo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos NA (N1 y N2) han causado epidemias humanas (Bouvier y palese, 2008). El conocimiento sobre porque de esta limitación de los antígenos a nivel interespecifico no se conoce (Webster et al., 1992).

Los virus de la influenza se denominan taxonómicamente de la siguiente manera: En primer lugar el tipo de virus de influenza A, B o C, indicándose a

continuación el organismo huésped del que se ha aislado, si la variante viral no es de origen humano. Posteriormente se incluye el origen geográfico de la variante aislada, número de laboratorio de la variante y año de aislamiento seguido entre paréntesis la descripción antigénica del subtipo HA y NA. Ejemplo. A/México/InDRE 4487/2009 (H1N1).

VI.1.2. Organización del genoma

Este subtipo consta de ocho segmentos de RNA que codifican a las proteínas (HA, NA, y las proteínas de la matriz (M1/M2), las cuales forman parte de la morfología viral (Roberts et al., 1998; Burleigh et al., 2005). Los otros cinco segmentos codifican para las tres polimerasas (PB2, PB1 y PA), dos proteínas no estructurales (NS1/NS2) y la nucleoproteína (NP) (Cheung y Poon, 2007; Nayak et al., 2009). La HA, es codificada por el segmento de RNA cuatro. El tamaño de este segmento de RNA es de 1770 nt (Hay, 1998). Es un antígeno integral de la membrana, y se caracteriza por dos funciones esenciales en la infección viral, es responsable de la unión de los virus al receptor del huésped y la fusión de membranas viral y celular, para la introducción del genoma viral en la célula infectada (Webster et al., 1992; Cheung y Poon, 2007).

La NA es codificada por el segmento de RNA seis, el tamaño de este segmento de RNA es de 1423 nt (Hay, 1998). Es un segundo antígeno de superficie del virus, y su función principal es la liberación de nuevas partículas virales de los receptores de la célula huésped para la propagación del virus (Webster et al., 1992; Cheung y Poon, 2007). Las proteínas (M1/M2), son codificadas por

splicing alternativo, por el segmento siete. El tamaño del segmento de RNA de la proteína M1, es de 1027 nucleótidos (Hay, 1998) La proteína M1, se encuentra integrada a la membrana, esta proteína ingresa al núcleo para exportar al RNA genómico (vRNA) al núcleo (Nayak et al., 2009). La función principal de la M2, es el inicio de la maduración del virus, y actúa como un canal iónico, para activar el pH ácido (Nayak et al., 2009).

Las proteínas no estructurales NS1/NS2 son codificadas por splicing alternativo, por el segmento ocho. El tamaño del segmento de RNA de la proteína NS1, es de 890 nt (Hay, 1998). La función de NS1 es la de transporte, división y traducción del mRNA. La función de la proteína NS2 es la exportación de la ribonucleoproteína (RNP), desde el núcleo al citoplasma en la célula del huésped. La polimerasa PB2, es codificada por el segmento uno, el tamaño del segmento de RNA 2341 nucleótidos (Hay, 1998). Su función principal es la iniciación de la transcripción viral. La polimerasa PB1 es codificada por el segmento dos, el tamaño del segmento de RNA 2341 nucleótidos (Hay, 1998). Su función principal es la de transcriptasa y polimerización. La polimerasa PA es codificada por el segmento tres, el tamaño del segmento de RNA 2233 nucleótidos (Hay, 1998). Y su función está implicada en la replicación del RNA viral y transcriptasa (Li et al., 1994; Cheung y Poon, 2007).

VI.1.3. Características de la glicoproteína HA

La glicoproteína HA, reconoce a las células del tracto respiratorio superior, mediante la unión al receptor ácido siálico (Wilks et al., 2012). La HA es uno de

los antígenos virales, al cual se dirige la respuesta inmunológica neutralizante. El reconocimiento de los anticuerpos por la HA, está relacionado con los cambios conformacionales de los epítopes de la proteína. Cuando la célula huésped está infectada, la HA se sintetiza como un polipéptido precursor (HAo), el cual es hidrolizado por proteasas del huésped, en dos subunidades proteicas (HA1 y HA2), por las serin-proteasas. Esta modificación post-transcripcional es importante para la infectividad viral (Bouvier y Palace, 2008). Evolutivamente se considera a la subunidad HA2, más conservada, que la subunidad HA1. Esto se debe a que la HA2 contiene la cola citoplasmática y la región hidrofóbica que permite el anclaje a la membrana, en cambio la HA1 es responsable de la antigenicidad (Both et al., 1983). Debido a los aminoácidos conservados de la HA2, esta región se caracteriza por su amplio espectro de protección contra el virus de la influenza; y es muy útil para la generación de vacunas contra brotes emergentes (Lee et al., 2013).

VI.1.4. Tasa de mutación del virus de influenza y su epidemiología

Debido a la alta tasa de mutación que presenta el virus de influenza A (H1N1) de (1.5×10^{-3} y 1.6×10^{-3}), históricamente han sido usados como modelos experimentales para el estudio de su evolución molecular (Moya et al., 2004; Khandaker et al., 2013). Esta alta tasa de mutación, permite al virus escapar al sistema inmune del huésped (Holmes, 2003), ocasionando entre 250,000 a 500,000 muertes por año, por lo que se le considera una de las enfermedades infecciosas más importantes a nivel mundial (Holmes, 2003; Taubenberger y

Kash, 2010; Khandaker et al., 2013). La pandemia más devastadora registrada a la fecha, fue la gripe española A (H1N1) de 1918, que se estima, ocasionó una mortalidad de aproximadamente, unas 50 millones de personas (Neumann et al., 2009). Las pandemias subsecuentes, fueron la gripe asiática, H2N2 y la gripe de Hong Kong, H3N2, originarias de China, y provocó de 70,000 y 34,000 muertes respectivamente tan solo en Estados Unidos (Taubenberger y Kash, 2010). La gripe más reciente es la A (H1N1) pandémica (pdm) 09, la cual surgió en el 2009, originada por la recombinación de genes de aves, cerdos y humanos (Taubenberger y Kash, 2010).

VI.1.5. Deriva antigénica

La deriva antigénica es una de las fuerzas evolutivas, que moldean la biodiversidad. Este mecanismo genera la variación de los virus, a través del tiempo, que implica la acumulación de mutaciones puntuales espontáneas en el gen que codifica la HA de un subtipo de virus de la influenza (Webster et al., 1992; Coloma et al., 2009). Estas variaciones originan la presencia de un virus con una HA distinta a la del virus precedente. Debido a esta variación los anticuerpos del huésped no logran reconocer a los antígenos del virus, produciéndose nuevas variantes virales, lo que ocasiona la evasión al sistema inmune del huésped (Carrat y Flahault, 2007). En las variaciones menores, cada mutación sustituye uno o pocos aminoácidos de las proteínas codificadas por los distintos segmentos de RNA de este virus. La velocidad de la deriva antigénica es diferente para las distintas proteínas, siendo muy rápida para la

HA y con menor rapidez para la NA (Webster et al., 1992). Estas mutaciones menores generalmente, provocan brotes epidémicos más limitados. Sin embargo, las variaciones mayores ocasionadas por recombinación ó reordenamiento genético, implican un cambio total antigénico del virus de influenza. Este cambio mayor, es el que introduce un subtipo viral distinto al que circulaba, el cual provoca pandemias por influenza.

Los nuevos subtipos del virus de influenza A, emergen por el reordenamiento genético de las variantes parentales, que infectan a múltiples huéspedes. Los ocho segmentos de RNA pueden recombinarse aleatoriamente, cuando una célula sufre una infección doble de diferentes subtipos de virus. También puede resurgir un nuevo subtipo que circuló años atrás en la población humana. Los virus de la influenza A, causan epidemias anuales debido a la amplia deriva antigénica que presenta la subunidad HA1 (nucleótidos 52-1029), y pandemias que no son muy frecuentes. Las nuevas variantes virales desplazan a las más viejas anualmente (Lee et al., 2013; Khandaker et al., 2013).

VI.1.6. Selección positiva

La selección natural es otro proceso evolutivo, que juega un papel importante en la evolución viral, junto con la deriva antigénica. La selección adaptativa positiva, aumenta la frecuencia de alelos, que confieren una ventaja de aptitud en relación con el resto de la población y promueve la diversidad genética (Posada, 2009). La fuerte presión de selección del virus permite que los epítopes de la HA1 evolucionen rápidamente, para evadir la respuesta inmune

del huésped (Khandaker et al., 2013). Diversos estudios muestran a una serie de aminoácidos de la HA, que evolucionaron bajo selección positiva durante los últimos 40 años (Blackburne et al., 2008)

Es importante entender y monitorear la dinámica evolutiva de los virus de la influenza A que están circulando, para su control. De esto depende la eficacia de las vacunas, ya que se puede reducir debido a diferencias entre la variante vacunal, la variante que está circulando, y la poca habilidad del huésped para generar una respuesta inmune. Por todo lo anterior el objetivo de este capítulo es, investigar los procesos de adaptación evolutiva del virus de influenza A (H1N1), durante la pandemia del 2009 en la población Mexicana, mediante un análisis de evolución molecular.

VI.2. Materiales y métodos

VI.2.1. Bases de datos

Se obtuvieron 131 secuencias de nucleótidos del virus de la influenza A (H1N1) del gen completo de hemaglutinina (HA) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.html>) de humano, nueve secuencias de cerdos A (H1N1 y H1N2), una secuencia de influenza estacional A (H1N1) y dos secuencias de aves AH1N1 (Anexo I). Estas secuencias fueron alineadas utilizando los programas Clustal W disponible en (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) y MAFFT (Posada, 2009). Se realizó la detección de haplotipos repetidos con el programa DnaSP (versión 5) (Librado y Rozas, 2009), que se encuentra disponible en la pagina (http://www.ub.edu/dnasp/DnaSP_OS.html). El porcentaje de identidad de las secuencias, se llevó a cabo con el programa BIOEDIT v7.0.9 disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

VI.2.2. Análisis filogenético

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa Mr.Bayes v3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Como grupo externo se utilizó a la variante del virus de influenza A (H1N1)/Brazil/1978. Para identificar el modelo evolutivo, que mejor describe a las secuencias, se usó el programa jmodeltest versión 2.1.6 (Posada, 2009). El modelo elegido fue GTR+I+G (General time Reversible). Para determinar las tasas de sustitución y el tiempo

de divergencia, se utilizó el reloj molecular de las secuencias con el programa evolutivo bayesiano BEAST v1.8.0 (Drummond y Rambaut, 2007) con el modelo de sustitución plus general-time reversal (GTR) y cuarenta millones de algoritmos de Markov Monte Carlo (MCMC). Este programa provee información sobre las tasas generales de evolución molecular y tiempos en todos los nodos del árbol filogenético que se crea. Dentro del MCMC se utilizó el modelo Bayesian Skyline Plot (BSP), para obtener un análisis de la dinámica poblacional. Para comparar los datos se utilizó el modelo de reloj uncorrelated log normal relaxed clock (Khandaker et al., 2013). Los resultados obtenidos fueron examinados con el programa TRACER v1.6 (Drummond y Rambaut, 2007). Los árboles filogenéticos se construyeron y se visualizaron usando los programas Tree Annotator y FigTree versión 1.4.1.

VI.2.3. Análisis de recombinación y selección positiva

La detección de señales de recombinación en el gen hemaglutinina se llevó a cabo con los programa RDP4 Beta 4.46 (Martin et al., 2010). En este programa se utilizaron los nueve métodos de análisis para la recombinación (RDP, GENECONV, BootScan, Rescan, MaxChi, 3seq, Siscan, Lard y Phypro). Y también se utilizó el programa Datamonkey (Sergei et al., 2005), con los métodos (MEME y GARD). Para la estimación de la presión de selección, primeramente se cuantificó la proporción de cambios sinónimos (dS) y no-sinónimos (dN), con el programa DNaSP v5. Para identificar la existencia de selección positiva, en este gen, así como los sitios de codones individuales, se

utilizó el programa Datamonkey con los métodos (SLAC y FEL), se especificó un nivel de confiabilidad ($P = 0.1$ y $BF = 50$) gen/sitio dN/dS

VI.3. Resultados

VI.3.1. Inferencia filogenética de los cuatro clados

Esta investigación, constituye el primer estudio filogenético, del virus de la influenza subtipo A (H1N1) que circuló en México en el periodo 2009 - 2012. La inferencia filogenética basada en los análisis bayesianos (Mr.Bayes y BEAST) mostró una topología muy similar. Estos análisis identificaron tres clados que intercambian bifurcaciones reconectadas (Fig. 1 y 3). El primer clado incluye a las variantes del virus de influenza del 2009 – 2014, que divergieron del segundo clado representado por las variantes de influenza de 1978 - 2009 (Figs. 1, 2 y 3).

El primer clado, resultó como un grupo monofilético, es decir estas variantes virales comparten un ancestro común. Este primer clado se divide en cuatro subgrupos. El primer subgrupo está conformado por variantes virales de Brasil, Inglaterra, China, México, España, Japón y Estados Unidos del 2010 – 2014. El segundo subgrupo lo representan variantes de México, España, Japón, Argentina del 2010 - 2009 y dos variantes de influenza de cerdo de Estados Unidos y México del 2009 – 2010. El tercer subgrupo está conformado en mayor parte por la variante viral mexicana del 2009 y el tercer subgrupo, que se encuentra entre la bifurcación del primer y segundo clado. Este subgrupo está constituido por cinco variantes de influenza porcina, una de estas variantes es representada por el subtipo viral (H1N2) de Korea del 2006 y sus variantes

hermanas representadas por el subtipo viral A (H1N1) de Estados Unidos de 1991 y 2014; México del 2010 y Korea del 2005 (Fig. 1, 2, y 3).

El segundo clado, igual que el primer clado también resultó ser monofilético, y lo conforman dos subgrupos. El primer subgrupo está representado por México, China, África, Inglaterra, Tailandia y Estados Unidos del 2006 – 2009; el segundo subgrupo lo representan, África, Japón, Inglaterra, china, Estados Unidos, Camboya e Islas Solomon de 1991, 1995, 1997, 2000, 2001, 2006, 2007 y 2008. El tercer clado lo representan dos variantes virales de cerdos, uno de Dinamarca y China de 1993 y 2007, respectivamente, también está representado por dos variantes de aves de Estados Unidos y España de 1994 y 2007 respectivamente (Fig. 1, 2, y 3).

VI.3.2. Probabilidad posterior Bayesiana y Porcentaje de identidad

El primer clado, representado por el subtipo A (H1N1, periodo 2009 - 2014), muestra el surgimiento de una nueva variante viral, con una variación genética muy dinámica en los últimos años, en Sudamérica, Asia y Europa. En este clado, se observa un subgrupo que incluye, una variante viral porcino de los Estados Unidos del 2009, con un porcentaje de identidad del 99% con respecto a la variante viral humana de Japón del 2010, y con una probabilidad posterior Bayesiana de 0.94 (Fig. 1 y 2). Entre las variantes virales A (H1N1) de humanos, pertenecientes a España, Argentina y México del 2009, se observa una variante hermana que pertenece a la variante viral porcino mexicano del 2011, con una longitud de rama más prolongada a la de sus variantes

hermanas. El segundo subgrupo de este primer clado (entre la bifurcación) lo conforma la variante de influenza porcina A (H1N2) de Korea del 2006 que muestra un porcentaje de identidad del 92% con respecto a la variante porcina A (H1N1) de Estados Unidos del 2014, y con una probabilidad posterior Bayesiana de 0.99. Las variantes de influenza porcina A (H1N2) de Korea del 2006, son idénticas a las variantes virales porcinas de Estados Unidos, México y Corea (con una probabilidad posterior Bayesiana de uno) (Fig. 1).

El segundo clado está representado por las variantes de influenza de 1978-2009, muestra a una variante viral anterior al 2009, que no ha estado activa en los últimos años. A este clado lo representan variantes de influenza de África, Europa, Asia y América del Norte. La mayoría de estos subgrupos muestran una probabilidad posterior Bayesiana de uno. El tercer clado está representado por las variantes de influenza porcina de Dinamarca de 1993 que muestra un porcentaje de identidad del 91% con respecto a la variante porcina de China del 2007, con una probabilidad posterior Bayesiana de 1. Y sus variantes hermanas son aves de Estados Unidos de 1994 y España del 2007, que tienen una probabilidad posterior Bayesiana de uno (Fig. 1 y 2).

VI.3.3. Recombinación y selección positiva

Los métodos MEME y GARD, corridos con el programa Datamonkey, no detectaron recombinación en el gen de la HA, de las secuencias analizadas. Estos resultados se comprobaron con los métodos BootScan y LARD, implementados con el programa RDP4, solo encontraron recombinación en las

siguientes secuencias: El posible ancestro fue la variante viral, CY038023SWDk93, y la variante recombinante fue FN38464DuckSp07, los puntos de ruptura de inicio y fin de las secuencias fueron en los nucleótidos 828-1179 y 1181-1625. El P-val. Del método BootScan fue de 2.96×10^{-02} y del método LARD fue de 3.71×10^{-315} . No se identificó recombinación, en todas las demás secuencias analizadas con los nueve métodos de recombinación que corresponden al programa RDP4.

La estimación de la proporción de cambios no-sinónimos (dN) y sinónimos (dS) realizada, con el programa DNaSP v5, se llevó a cabo separando los clados, en los tres clados la $dS > dN$. (Tabla II). Estos resultados se corroboraron con el programa Datamonkey con los métodos (SLAC y FEL), El método SLAC, mostró 222 sitios de selección negativa, con un nivel de significancia de 0.1, no detectó sitios de selección positiva, y el método FEL, identificó 302 sitios de selección negativa, con un nivel de significancia de 0.1, con cuatro sitios de selección positiva.

Tabla I. Mutaciones sinónimas y no-sinónimas de los virus de influenza A (H1N1) en los tres clados.

	Clado I	Clado II	Clado III
Número de secuencias	98	29	4
Mutaciones identificadas	388	293	391
Región codificante	1-1698	1-1698	1-1698
Región no codificante	1699-1701	1699-1701	1699-1701
Mutaciones sinónimas	261	200	318
Mutaciones no-sinónimas	127	93	73

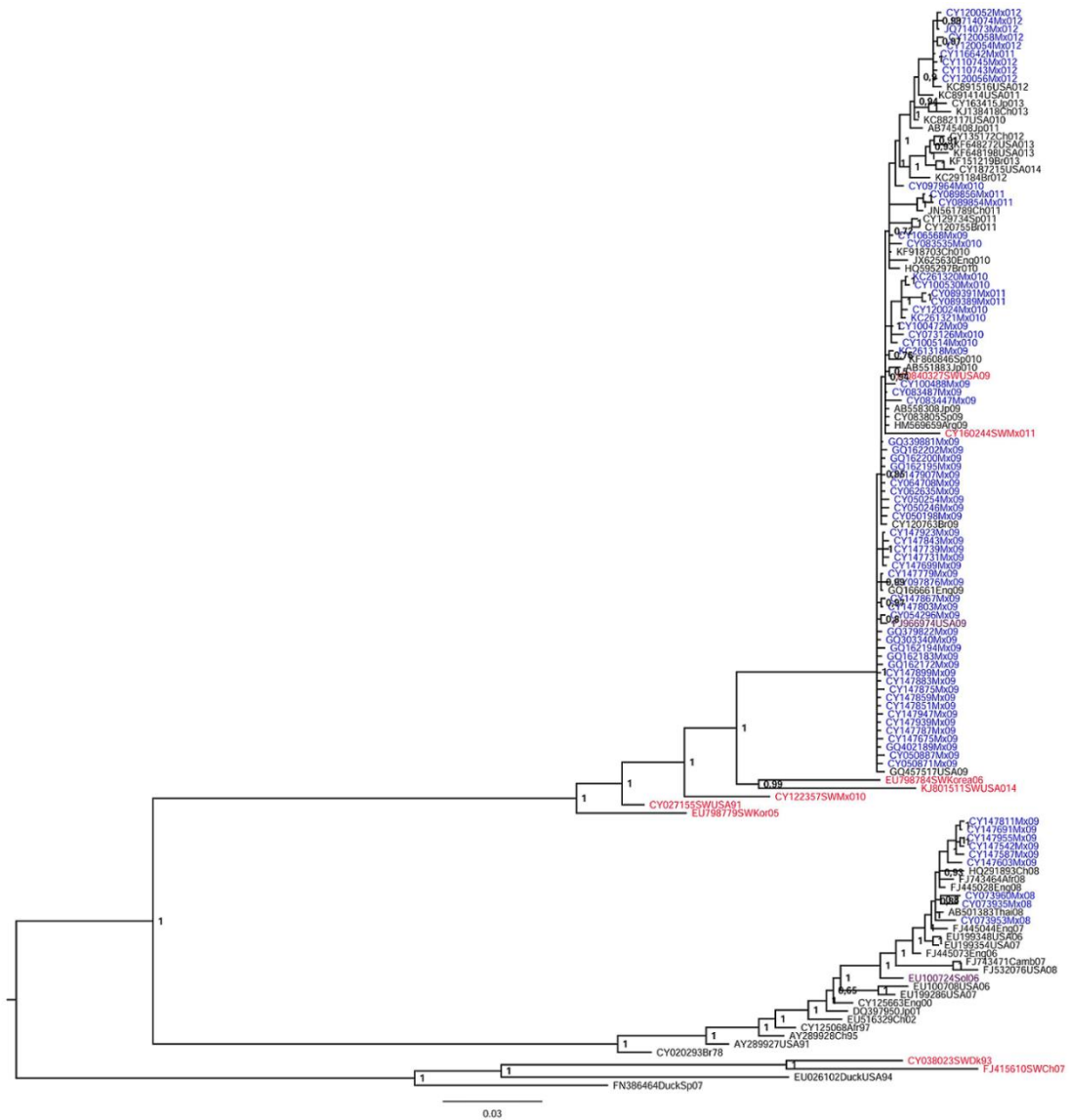


Figura 1. Árbol filogenético para el gen de HA de los virus de influenza A (H1N1), durante el periodo 1978 – 2014. Este árbol se construyó con el software Mr. Bayes 3.1.2. Los valores de los clados, representan la probabilidad posterior Bayesiana (BPP). Las etiquetas están conformadas por el número de GenBank, país y año de origen de la variante viral. Las variantes vacunales A/California/07/2009 y A/Solomon Islands/03/2006 se observan en color lila, las variantes virales porcinas se observan en color rojo

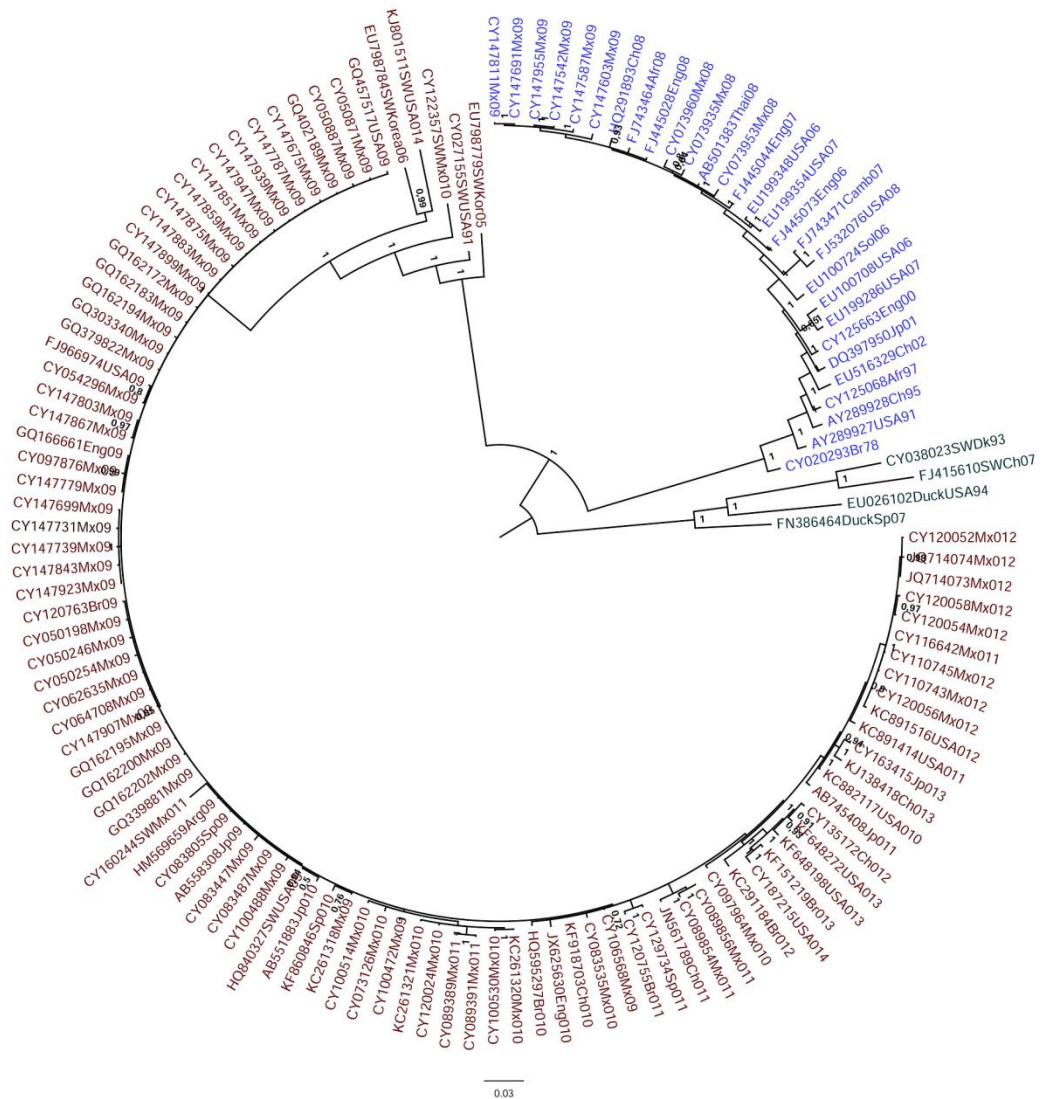


Figura 2. Árbol filogenético circular, para el gen de HA de los virus de influenza A (H1N1), durante el periodo 1978 – 2014. Este árbol se construyó con el software Mr. Bayes 3.1.2. Las variantes virales del clado uno, que pertenece al grupo genético siete, que predominó a nivel mundial se observan en color rojo las variantes virales del clado dos se observan en color azul y las variantes virales del clado tres en color verde.

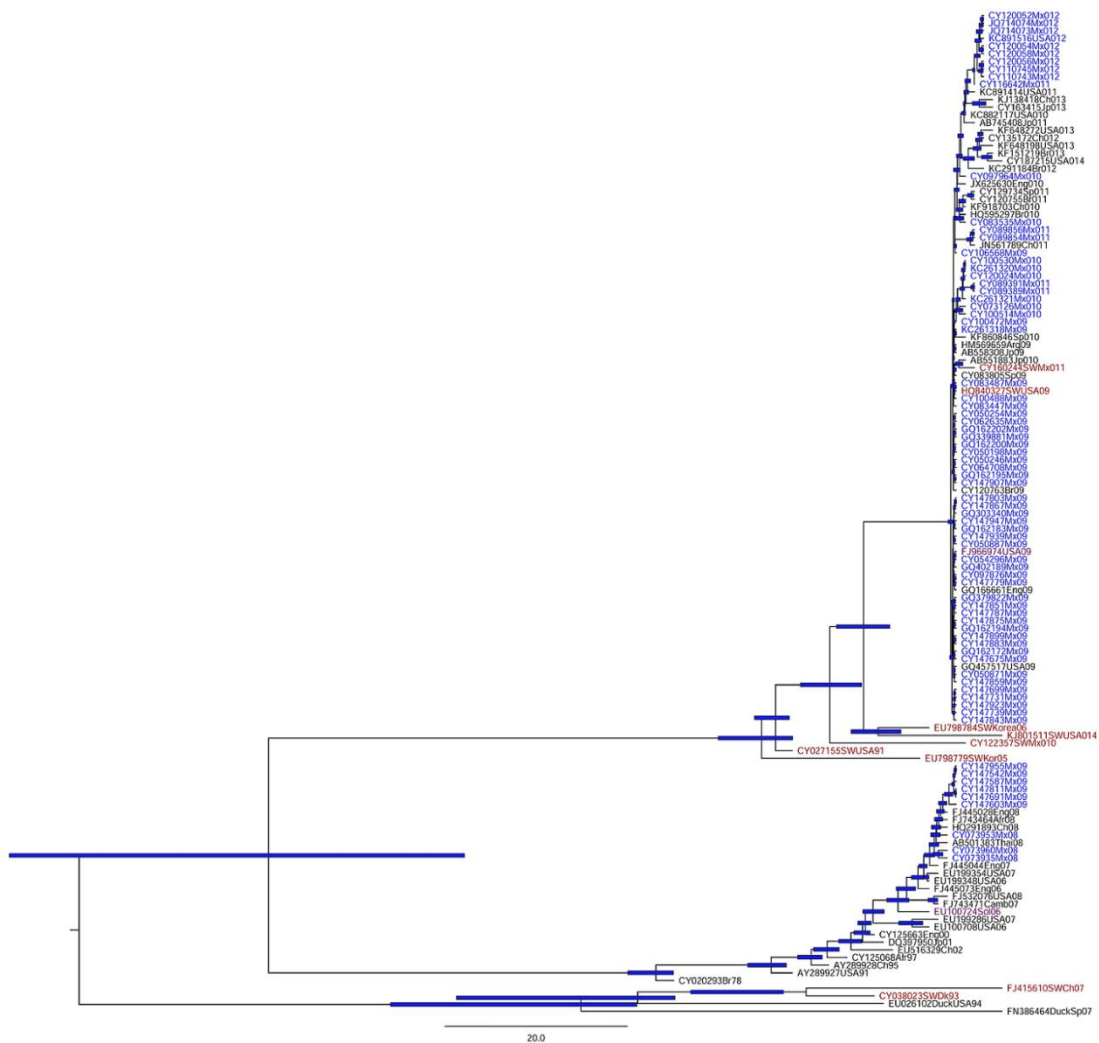


Figura 3. Árbol filogenético para el gen de HA de los virus de influenza A (H1N1), durante el periodo 1978 – 2014. Este árbol se construyó con el software Bayesian Evolutionary Análisis (BEAST v1.8.0). Las variantes vacunales A/California/07/2009 y A/Solomon Islands/03/2006 se observan en color lila, las variantes virales porcinas se observan en color rojo y las variantes virales mexicanas en color azul.

VI.4. Discusión

VI.4.1. Clado uno, representado por la variante vacunal A/California/07/2009

El análisis filogenético del gen de la HA, evidencia que el clado uno, y la mayoría de las secuencias mexicanas del 2009 – 2012, se incluyen en el grupo genético siete, que predominó a nivel mundial (Nelson et al., 2009; WHO, 2012). La variante del subtipo viral humano A (H1N1) pdm y estacional, incluyendo a México (2009-2012), muestra la diversificación de este subtipo viral a varios continentes (América, Asia y Europa). Estos resultados concuerdan con lo reportado por (WHO, 2013). Los cambios evolutivos de este subtipo viral de influenza, son muy dinámicos desde el 2009 - 2014, el clado uno se caracteriza por el surgimiento de nuevos subgrupos. El tercer subgrupo de este clado (Fig. 1 y 3), que es en donde se ubica el aislado viral de la vacuna A/California/07/2009 (Número de GenBank, FJ966974). Esta variante viral vacunal muestra un 98% de identidad con las variantes virales del 2010 -2014, esto demuestra la divergencia de secuencias que existe entre los subgrupos del clado uno. Khandaker et al. (2013), muestra en sus resultados que las variantes virales del 2009 - 2012, tienen un ritmo de mutación constante para mantener su diversidad genética.

VI.4.2. Cambios de aminoácidos en la subunidad HA1 del virus de la influenza A (H1N1)pdm 09 desde el 2009 – 2014

El análisis de presión de selección de las secuencias de aminoácidos de la HA del clado uno, presentó 261 mutaciones sinónimas y 127 mutaciones no-sinónimas (Tabla II). Estas mutaciones revelaron una selección negativa ($dN < dS$). Castelán-Vega y colaboradores en el 2014, analizaron a los aminoácidos de secuencias de la HA del virus de la influenza A (H1N1)pdm 09 desde el 2009 – 2014, identificando nueve cambios en los aminoácidos de la subunidad HA1: D104N, K166Q, S188T, S206T, A259T y K285E Subunidad HA2: E47K, S124N y E172K que le dan estabilidad a la estructura de la proteína. Debido a esta presión selectiva a la fecha se han observado dos cambios de aminoácidos en el sitio antigénico (K166Q y S188T), que pudieran causar deriva antigénica (Castelán-Vega et al., 20014; Klein et al., 2014).

Jiménez-Alberto et al. (2013), estudiaron cuatro variantes de la hemaglutinina que fueron apareciendo en la pandemia A (H1N1) del 2009. La variante 1 (S143G, S185T) surgió para evitar el reconocimiento inmunológico: las variantes 2 (A134T) y 3 (D2222E, P297S) surgieron para aumentar la unión al receptor y la variante 4 (E374K) alteró la fusión del péptido. Las mutaciones benéficas o permisivas, que permiten el escape del virus a los anticuerpos de su huésped, también causan efectos secundarios negativos en la estabilidad (plegado de la proteína) y función de la proteína HA (Bloom et al., 2010). Existe el fenómeno epístasis (Es la interacción entre diferentes genes, consiste en que

cada gen puede enmascarar o suprimir la expresión del otro para un determinado carácter fenotípico y se le considera el factor principal de la evolución a nivel proteínas) positiva o negativa. En la epístasis positiva, las mutaciones negativas, son compensadas por mutaciones benéficas, estas mutaciones benéficas se pueden derivar por una alta capacidad replicativa viral. En cambio la epístasis negativa surge si la combinación de mutaciones da una baja capacidad replicativa (De visser y Elena, 2007). La teoría neutra de la evolución molecular, menciona, que la mayor parte de la variación a nivel molecular no es mantenida por la selección positiva, sino resultado de un balance entre la deriva génica (aleatoria) y las mutaciones neutras o casi neutras (Kimura, 1983; Ohta, 1992). Aún no está claro si la pandemia de origen porcino 2009 (H1N1), son callejones sin salida a nivel evolutivo, es decir si las variantes recombinantes de origen porcino, aviar y humano, conforme han estado circulando, han creado inmunidad humana contra ellos y las pocas variantes virales con mutaciones antigénicas benéficas para el virus, generan nuevas variantes virales capaces de extenderse por todo el mundo (Bloom et al., 2010; McHardy y Adams, 2009). En este cuello de botella evolutivo, participan la selección positiva, que crea diversidad genética y la frecuencia de estos mutantes se incrementa en la siguiente generación, y por otra parte la selección negativa o purificadora elimina esta diversidad, eliminando las variantes de la población (Posada, 2009).

VI.4.3. Clado dos representado por la variante viral

A/Solomon Islands/3/2006

La Organización Mundial de la Salud, en Octubre del 2007 y 2008, reportó actividad gripal A (H1N1) en África (principalmente en África del Sur), en América (principalmente en México y Estados Unidos), Asia, Europa y Oceanía, lo cual indica que, estos resultados coinciden con el segundo clado de los árboles filogenéticos reportados en esta investigación. El segundo clado está representado por la variante viral *A/Solomon Islands/3/2006* (Fig. 1 y 3). Filogenéticamente se comprobó, que esta variante viral, fue la que predominó en este periodo de tiempo, por lo tanto se utilizó como vacuna (WHO, 2007). Esta variante viral vacunal presentó un 75 – 77% de identidad con las variantes virales del 2009 – 2014. El análisis de presión de selección de las secuencias de aminoácidos de este clado dos presentó 200 mutaciones sinónimas y 93 mutaciones no-sinónimas (Tabla II). Igual que el clado uno, este clado dos también reveló una selección negativa ($dN < dS$). Análisis estadísticos realizados en 6219 nucleótidos de la HA demuestran, que estas viejas variantes no evolucionaron y poco a poco fue surgiendo la influenza pandémica A (H1N1), representada por la variante *A/California/07/2009* (Qi et al., 2014).

VI.4.4. El clado uno y tres son representados por variantes virales porcinas

Este es el primer trabajo de investigación en el que se obtiene un árbol filogenético, que muestra al clado uno, integrado por variantes virales porcinas

mexicanas, estadounidenses y coreanas entre la bifurcación de variantes del virus de influenza mexicana del 2009 (Fig. 1 y 3). La pandemia de influenza A (H1N1) del 2009, se originó por la recombinación de genes interespecífica entre cerdos, aves y humanos (Trifonov et al., 2009; Dawood et al., 2009). En el subtipo viral A (H1N1)pdm 2009 los genes (NA y M) estuvieron más estrechamente relacionados con los virus de influenza subtipo A que circulaba en los cerdos de Eurasia, y así surgió una nueva variante viral que no se había visto en México y en otros países (Dawood et al., 2009; Trifonov et al., 2009). El movimiento de cerdos vivos entre Eurasia y América del Norte, posibilitaron la mezcla de las diversas variantes virales porcinas.

Smith y colaboradores en el 2009, por inferencia filogenética determinaron que los virus porcinos, ancestros de esta epidemia han estado circulando, sin ser detectados aproximadamente de nueve a diecisiete años. Lo que sugiere que la recombinación de linajes porcinos ocurrió años antes de la epidemia A (H1N1) del 2009 (Garten et al., 2009). El virus de la influenza se encuentra en una constante presión selectiva por tratar de evadir el sistema inmune del huésped (Castelán-Vega et al., 2014; Klein et al., 2014). Algunos cambios de aminoácidos en el antígeno HA, producidos por la deriva antigénica, serán insignificantes mientras que otros cambios serán más benéficos para el virus (Smith et al., 2004; Smith et al., 2009). Algunos de estos cambios de aminoácidos serán benéficos y permitirán que el sistema inmune sea menos

eficaz en las variantes virales portadoras de estas sustituciones y más eficaz en las variantes virales con sustituciones insignificantes (Smith et al., 2004).

En las secuencias humanas de HA analizadas en este trabajo de investigación, no se detectó recombinación, aunque se identificaron variantes virales porcinas eurasiáticas (EU798784SWKorea06 (H1N2) y EU798779SWKorea05), entre la bifurcación de variantes del virus de influenza mexicana del 2009 en los árboles filogenéticos (Fig. 1 y 3). Estos linajes no fueron los precursores de las variantes virales A (H1N1) del 2009, analizadas en este trabajo.

La variante viral vacunal A/Solomon Islands/3/2006, representante del clado dos, mostró una baja identidad (75 – 77%), con las variantes virales del 2009 – 2014. Esto demuestra relaciones genéticas distantes entre el clado uno y dos. Quizá a esto se deba la rama con una longitud grande, entre la bifurcación de los clados uno y dos (Fig. 1 y 3). Las ramas con longitudes grandes, no son inusuales en los árboles filogenéticos realizados con secuencias de nucleótidos de virus de influenza porcinos, existen 52 ramas similares en longitud, reportadas en diversas investigaciones (Garten et al., 2009).

El clado tres está representado por dos variantes virales de cerdos Eurasiáticos de Dinamarca (A/Swine/Denmark/WVL9/1993) y China (A/Swine/Zhejiang/1/2007) (Fig. 1 y 3). Trifonov et al. (2009), señala que estas variantes virales dieron origen al grupo genético siete, que predomina a nivel mundial.

En uno de los subgrupos del clado uno, se observan dos variantes virales porcinas *A/swine/Minnesota/165A/2009* y *A/swine/Mexico/SG1450/2011*, entre las variantes de influenza humano (Fig. 1 y 3). Alrededor del mundo los casos de infección humana por virus de influenza de origen porcino, se han reportado ocasionalmente. Se han confirmado 27 casos de infección humana por estos virus desde 1990 hasta 2010 (Centros para el control y la prevención de Enfermedades ó CDC, 2011-2012). De estos casos, 21 fueron producidos por virus de triple recombinación; 13 subtipos H1N1, un subtipo H1N2 y siete subtipos de H3N2, con genes de variantes de virus de influenza clásicos, aviar y humanos (Stephen et al., 2012). En el 2010 y 2011 diversos laboratorios públicos y el CDC, han confirmado casos humanos de influenza con la nueva variante viral de origen porcino (H3N2)v (Stephen et al., 2011). El gen M de la pandemia de influenza H3N2, fue heredado de una variante viral A (H1N1) 2009, esta variante viral solo se ha detectado en cerdos y aun no se detecta en humanos (Stephen et al., 2011). Por la identificación de dos variantes virales porcinas *A/swine/Minnesota/165A/2009* y *A/swine/México/SG1450/2011* entre las variantes de influenza humano. En este trabajo se recomienda que en México se realicen monitoreos constantes del virus de influenza del 2010 – 2012, por la reciente aparición de variantes virales de cerdos re-emergentes en la población humana.

VI.5. Conclusiones

- Los árboles filogenéticos Bayesianos (Mr. Bayes y BEAST), muestran a la mayoría de las variantes virales mexicanas en el grupo siete, que predominó a nivel mundial.
- El análisis de presión de selección reveló selección negativa en las secuencias de HA, analizadas en este trabajo. Los árboles filogenéticos evidencian, que existe divergencia genética entre el clado uno (variantes virales 1978 – 2009) y el clado dos (variantes virales 2009 – 2014). Quizá esté ocurriendo el fenómeno de epístasis o se está creando un cuello de botella evolutivo.
- No se detectó recombinación, en el gen de la HA de las variantes virales humanas A (H1N1), este evento evolutivo podría deberse a la falta de secuencias de variantes virales porcinas precursoras.
- En el clado uno, se observan dos variantes porcinas entre las variantes de influenza humana del 2010 al 2014, es probable que este empezando a surgir y no haya sido identificada formalmente, una nueva variante viral de gripe en México y los demás países involucrados en este estudio. Es necesario que se haga un monitoreo constante para poder detectar de forma oportuna los cambios evolutivos de las nuevas variantes virales porcinas-humanas A (H1N1) en este 2015.

VI.6. Puntos clave del capítulo III

- 1.- Los virus de influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, cuya característica es la segmentación de sus genes. La segmentación es considerada un gran avance evolutivo, debido a que este mecanismo permite todas las combinaciones posibles de genes de diferentes subtipos virales que infectan al huésped.
- 2.- La pandemia de influenza A (H1N1) del 2009 se originó por la recombinación interespecífica de genes de cerdos, aves y humanos.
3. Los árboles filogenéticos Bayesianos (Mr. Bayes y BEAST), muestran que existe divergencia genética entre el clado uno (variantes virales 1978 – 2009) y el clado dos (variantes virales 2009 – 2014).
4. En las variantes virales A H1N1 analizadas en este trabajo de investigación, no se detectó recombinación y la selección fue negativa, quizá esto se deba al fenómeno de epístasis o se está creando un cuello de botella evolutivo.
- 5.- Los árboles filogenéticos, presentaron variantes virales porcinas entre las variantes virales mexicanas del 2010 al 2014. Es importante que en México, el virus de influenza se esté monitoreando permanentemente, debido a que las recientes pandemias del siglo XX parecen haber sido generadas por eventos de reordenamientos genéticos entre cerdos y humanos.

VII. Capítulo IV

Co-evolución de los virus y su huésped

El objetivo de este capítulo, es definir los procesos de co-evolución del IHHNV y el A (H1N1) en sus respectivos huéspedes.

VII.1. IHHNV, infección persistente: Co-evolucionando con el enemigo

Diversas investigaciones han demostrado que crustáceos e insectos, pueden estar infectados de forma persistente con uno o más virus, con un nivel de replicación bajo, sin presentar signos de enfermedad (Flegel, 2009). Una de las observaciones importantes en el capítulo II, es que postlarvas, juveniles y adultos de *L. vannamei* y *L. stylirostris* fueron resistentes al IHHNV.

La explicación a esos resultados, es que las evolucionadas estrategias virales sobre el control de la expresión génica determinan la complejidad y duración de las infecciones, desde una interacción muy breve, entre el virus y su hospedador (infección aguda), hasta las infecciones que duran toda la vida del organismo huésped (persistente o latente) (Cann, 2009; Hoffmann et al., 2010). Una de las ideas equivocadas es que toda infección vírica provoca una enfermedad. Existen diversas investigaciones que indican que existen infecciones asintomáticas y solo una minoría de las infecciones víricas originan síntomas o signos de enfermedad (Cann, 2009; Hershberger, et al., 2010; Goic, y Saleh, 2012).

En la infección persistente el patógeno y el huésped co-existen, beneficiándose ambos organismos. Mediante esta infección el virus tiene la capacidad de ser transmitido a otros organismos y a la descendencia (Flegel, 2009; Goic y Saleh,

2012). La infección persistente puede ocasionar infección latente, infección mutualista simbiótica (Roossinck, 2011; Goic y Saleh, 2012). En la infección simbiótica, los virus son adoptados por su huésped (virus endógenos) y suelen tener un efecto positivo en este, ya que pueden contribuir a la resistencia del huésped (Horie et al., 2010; Hershberger et al., 2010; Goic y Saleh, 2012). El efecto positivo de los virus mutualistas, es que le proporcionan al huésped nuevos resultados benéficos (Noreen et al., 2007).

Por otro lado, la sobrepoblación y pérdida de variabilidad genética poblacional son condiciones ideales para que un virus asintomático pueda ocasionar una infección aguda (Goic y Saleh, 2012). Bajo esta situación se reduce la población del hospedero y a través de la selección natural solo sobrevivirán los individuos adaptados al virus generando una resistencia evolutiva (Goic y Saleh, 2012).

VII.1.2. Infección persistente en artrópodos

Los artrópodos han estado presentes en la tierra desde el periodo cámbrico, debido a esto Goic y Saleh (2012) entre otros, han planteado la hipótesis de que los artrópodos tienen mejores mecanismos de adaptación a diversos patógenos que los mamíferos por ser más antiguos. Los artrópodos, co-existen con los virus y presentan infecciones persistentes, sin desarrollar enfermedades letales (Goic Saleh, 2012; Flegel, 2009). Los artrópodos en ausencia de una memoria inmunológica, encontraron la manera de controlar y disminuir la replicación viral mediante la infección persistente (Goic Saleh, 2012; Flegel, 2009). Un ejemplo de esto se puede encontrar en el camarón *Penaeus*

monodon, el cual es infectado de forma persistente por el IHHNV, y no presenta patogenicidad (Withyachumnarnku et al., 2006), es decir ya existe una co-evolución entre patógeno y huésped. Sin embargo el IHHNV se propagó al continente americano e impactó severamente a las especies nativas *L. stylirostris* y *L. vannamei* debido a que el sistema inmune adaptativo de estas especies no habían tenido contacto con este virus (Lightner, 1996).

VII.1.3. Endogenización de parvovirus en el genoma de eucariotas

La endogenización de los parvovirus en el genoma de eucariotas, es uno de los procesos de co-evolución entre el virus y su huésped. Otro resultado derivado del capítulo II, es la detección de resultados falsos positivos en el diagnóstico del IHHNV utilizando el método 309 F/R en las etapas de desarrollo de postlarvas, juveniles y adultos de *L. vannamei* cultivados en México. Tang y Lightner, en el (2006) y Saksmerprome et al. (2011), identificaron inserciones de secuencias del genoma del IHHNV, denominados transposones en el genoma de *P. monodon* originario de África y Australia. La familia Parvoviridae se clasifica en dos subfamilias, la Parvoviridae (virus de vertebrados) y Densoviridae (virus de artrópodos), en esta sub-familia se encuentra el IHHNV (Fauquet et al., 2005). Esta familia de virus suele producir infecciones persistentes, sin enfermedad aparente la cual está relacionada con su capacidad de integrarse al DNA cromosómico y establecer una infección latente (Liu et al., 2011).

La identificación de secuencias ortólogas de parvovirus en el genoma de mamíferos sugiere que los parvovirus han co-existido con los mamíferos durante 98 millones de años (Liu et al., 2011). Se han aislado secuencias integradas del virus adeno-asociado AAV de células somáticas (línea celular de humanos), y por mapeo de híbridos se concluyó que el genoma de AAV se integra específicamente en el cromosoma 19 (Kotin et al., 1990). También se han realizado análisis filogenéticos de genomas de eucariotas que se encuentran en la base de datos, confirmando que homólogos de proteínas de los parvovirus han sido integrados (endogenización) en el genoma nuclear de varios animales (Liu et al., 2011).

Otro resultado derivado del capítulo II, es que en la infección experimental las postlarvas, juveniles y adultos de *L. vannamei* y *L. stylirostris* fueron resistentes al IHNV. Existe la hipótesis de que los insectos y crustáceos reconocen el mRNA virales y lo utilizan para la inserción aleatoria de secuencias en su DNA genómico, estas secuencias insertadas producen RNA de interferencia (iRNA) y reducen la replicación viral (Flegel, 2009). La infección por virus de DNA o RNA a las células del huésped, origina mRNA viral, este mRNA será reconocido por la transcriptasa reversa (RT) del huésped (Flegel, 2009). La RT sintetizará aleatoriamente fragmentos de cDNA a partir del mRNA viral, los fragmentos de cDNA serán transportados al interior del núcleo para que la enzima integrasa (IN) inserte los fragmentos de cDNA al genoma del huésped, para que se produzca el RNA inmunoespecífico (imRNA), el RNA de doble cadena (dsRNA) y el RNA de interferencia (iRNA) (Flegel, 2009; Goic y Saleh, 2012). El iRNA,

forma parte de un proceso evolutivo, en donde el dsRNA inhibe la expresión y traducción génica, mediante la degradación del mRNA (La Fauce y Owens, 2009; Labreuche y Warr, 2013; Wang et al., 2014). Por lo tanto el iRNA reduce la carga viral, originando las infecciones virales persistentes (Flegel, 2009). En ausencia de un sistema inmune adaptativo en los artrópodos, el proceso de producción del imRNA (memoria de DNA), equivale a la función que realizan los anticuerpos en vertebrados (Flegel, 2009; La Fauce y Owens, 2009; Goic y Saleh, 2012; Labreuche y Warr, 2013).

VII.1.4. Ventajas y desventajas de los elementos movibles en el genoma de los organismos

Una manera en la que los eucariotas obtienen inmunidad contra los virus es mediante los elementos endógenos virales (EVES), controlan la expresión y codificación de nuevas proteínas, que pudieran ofrecer inmunidad en contra de los virus (Jern y Coffin, 2008; Feschotte y Gilbert, 2012). Sin embargo, estos elementos también pueden causar efectos dañinos a su huésped, las repeticiones terminales de secuencias (LTR), que son características de los EVES, contienen promotores que son reconocidos por muchos factores de transcripción, controlando las señales de terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA, produciendo efectos dañinos en la epigenética del huésped (Jern y Coffin, 2008; Feschotte y Gilbert, 2012). Los EVES también pueden generar una sobreexpresión en las proteínas que participan en el

sistema inmune del huésped, e inducir una cascada inflamatoria, provocando una enfermedad auto-inmune (Feschotte y Gilbert, 2012).

La transferencia horizontal de genes (HGT), es la transferencia de la información genética entre diversos organismos. En bacterias la HGT, se lleva a cabo mediante la transferencia de información genética de una célula a otra célula diferente, con la mediación de plásmidos. En los organismos con reproducción sexual, la HGT es equivalente a la recombinación cromosómica (Hotopp et al., 2007). Existen evidencias científicas que en eucariotas la HGT proviene principalmente de protistas (Keeling y Palmer, 2008; Boucher et al., 2003; De la Cruz y Davies, 2000). Este material genético permitirá la adquisición de nuevas características evolutivas, que le otorgaran ventajas ó desventajas adaptativas al organismo que la realice (Dunning, 2011; Keelingy Palmer, 2008). Esta transferencia genética se da con mayor frecuencia en la relación endosimbiótica, debido a la aproximación celular de ambos organismos (Dunning, 2011)

Uno de los ejemplos más estudiados de la transferencia de genes son los elementos móviles o transposones. Los transposones son secuencias que se integran en cualquier sitio del cromosoma del huésped como molécula de DNA, por la enzima integrasa codificada por el virus. Estas secuencias del DNA vírico, son cortadas por la enzima recombinasa de un sitio genómico, e integradas en un nuevo sitio del genoma (Kazazian, 2004; Cordaux y Batzer, 2009). La enzima realiza una hidrólisis en los enlaces fosfodiéster del elemento

transposon y en la secuencia cromosómica en la que se inserto el transposon, liberando oxidrilos (OH), la enzima transposasa se encarga de unir al elemento transposon, en un nuevo sitio duplicando estas secuencias, de forma invertida (Kazazian, 2004). Los transposones se identifican principalmente en bacterias y también se reconocen en genomas de metazoarios, como insectos, gusanos y humanos. Existen varios elementos importantes de transposones como las transposasas Mu, transposones P, integrasas de repeticiones terminales largas (LTR), retrotransposones y retrovirus (Kazazian, 2004). Los transposones tipo P se han observado en cruces genéticos intraespecíficos en las células germinales provenientes de *Drosophila willistoni* (Daniels et al., 1990). También se han identificado transferencia de genes de la bacteria *Wolbachia pipientis* (simbionte citoplasmico de insectos, crustáceos y nematodos) a diversos taxas de invertebrados (Stouthamer et al., 1999; Hotopp et al., 2007).

Otro ejemplo de la transferencia de genes son los retrotransposones (LTR), la enzima transcriptasa inversa, codificada por el RNA del retrovirus, empaquetada en cada cápside vírica durante la producción de nuevas partículas víricas, hace una copia en DNA de la cadena de RNA del virus, la molécula de DNA lineal del virus es reconocida por una integrasa codificada por el virus que cataliza la inserción de este DNA vírico en el genoma del huésped (Kazazian, 2004). La mayor parte de los retrotransposones incluyen largas repeticiones terminales con secuencias poliadeniladas en el extremo 3'. Los LTR y retrovirus son similares en los primeros pasos de la replicación retroviral,

tienen las mismas actividades enzimáticas para la síntesis de cDNA, la transcriptasa reversa (RT), ribonucleasa (RH) e integrasa (Kazazian, 2004), y posteriormente la integración de la copia del cDNA dentro del cromosoma de la célula huésped (Schröder et al., 2002). Los retrovirus más conocidos son los virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) y el Virus de la Leucemia del Ratón (MLV), que generalmente se insertan en sitios de genes activos en su transcripción (Schröder et al., 2002; Wu et al., 2003),

Aproximadamente un tercio del genoma humano está compuesto por retrotransposones no autónomos como los elementos Alu (se identificaron mediante la endonucleasa Alu, de la cual recibieron su nombre), y SVA (Cordaux y Batzer, 2009). Estos retrotransposones no autónomos se identifican en la región no traducida (UTR) y tienen señales de poliadenilación de varias longitudes (Cordaux y Batzer, 2009). En el genoma humano se encuentran 3000 copias de los elementos SVA, su longitud es de 2 kb y se localizan en repeticiones en tándem (Ostertag et al., 2003). Los elementos Alu, son los transposones más exitosos por su número de copias en este genoma, su longitud es de 300 pares de bases y se encuentran corriente abajo del genoma flanqueado por repeticiones de timina, estos elementos funcionan con la maquinaria enzimática de los elementos L1 (Dewannieux y Heidmann, 2003).

Hoy en día, se está investigando el mecanismo por el cual, los segmentos de DNA se transfieren desde la célula de la bacteria y se integran en los cromosomas de los eucariotas. Sin embargo hay muy poca información sobre la

transferencia de los segmentos de DNA virales a sus huéspedes. Esta información tendría implicaciones prácticas en biotecnología y medicina. La secuenciación del genoma completo de los organismos y su análisis comparativo mediante la filogenética, permitirán explicar el origen, evolución y la redistribución del genoma de los organismos (Daubin, 2004). El desarrollo innovador de los métodos moleculares como: Métodos evolutivos computacionales en la genómica comparativa, secuenciación de genomas completos y los ensayos de retrotransposición en cultivo celular, han dado como resultado un avance significativo en el conocimiento de las ventajas y desventajas de las actividades evolutivas de los transposones en el genoma de los organismos.

VII.2. Dinámica evolutiva del virus de influenza subtipo A (H1N1)

En el capítulo III, se investigó la evolución molecular de la hemaglutinina del virus de la influenza subtipo (H1N1) en México del 2008 al 2012. Los árboles filogenéticos realizados con programas filogenéticos Bayesianos, mostraron una clara bifurcación, con dos clados entre los virus de 1978 al 2009 y los virus del 2009 al 2014. Estos resultados coinciden con el surgimiento de la nueva variante de virus de influenza subtipo A (H1N1) humana que apareció en el 2009 y fue responsable de epidemias y pandemias (Dawood, et al., 2009; Trifonov et al., 2009). Esta variante surgió por la co-infección de tres variantes del virus de influenza. El surgimiento de estas tres variantes se dio por recombinación de segmentos de los genomas porcino, aviar y humano (Dawood

et al., 2009; Trifonov et al., 2009). Este mecanismo evolutivo modificó el marco de lectura de los antígenos, por lo tanto el virus mutante reforzó su capacidad replicativa, fue más virulento, y se extendió a un nuevo huésped; el humano (Eigen, 1993; Domingo, 2006; Dawood et al., 2009; Trifonov et al., 2009).

La teoría indica que los virus son una unidad de selección, denominados quasi-especies. Estudiar el potencial evolutivo de los virus a través de la replicación de su genoma, dinámica poblacional, deriva génica y adaptación selectiva (positiva o negativa) es de gran importancia para su control y vigilancia (Domingo, 2006). Los virus mutantes refuerzan o limitan su capacidad replicativa e influyen en la patogénesis viral (Domingo, 2006). Las sub-poblaciones de virus (variantes), tienen una gran capacidad de adaptación selectiva a los cambios del entorno proporcionado por el sistema inmune del huésped. Estas sub-poblaciones evaden la defensa inmune del huésped mediante su regulación genética y por ende sus rasgos fenotípicos (Eigen, 1993; Domingo, 2006). Estos principios darwinianos se observan en períodos cortos de tiempo (días o semanas) en los huéspedes naturales y en huéspedes alternativos, como los cultivos celulares (Domingo, 2006).

Por lo anterior, el virus de la gripe del subtipo A presenta una gran diversidad genética ya que infecta a una amplia gama de especies, sin embargo sus reservorios naturales son las aves acuáticas silvestres (Webster et al., 1992). Debido a esta co-evolución entre el huésped y patógeno, el virus de la influenza presenta bajas tasas de cambio evolutivo en estas aves, alcanzando el

equilibrio para no ser patógeno, en estas especies (Webster et al., 1992). Este equilibrio permite que se refuerce la capacidad replicativa, con gran capacidad de adaptación selectiva y aumente la tasa de sustitución de nucleótidos a 1×10^{-3} (Eigen, 1993; Domingo, 2006; Chen y Holmes, 2006).

El aumento de la sustitución de nucleótidos (diversidad genética), permite un cambio en el fenotipo del virus, caracterizado por un aumento de la enfermedad o la propagación de una epidemia a un nuevo huésped susceptible (Chen y Holmes, 2006; Domingo, 2006). El cambio del fenotipo del virus se produce por la alta sustitución de aminoácidos dentro de los sitios de unión en sus antígenos (Hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (Carrat y Flahault, 2007). Esta variabilidad se da a través del tiempo y proviene de mutaciones (deriva genética), selección natural y recombinación de los segmentos de RNA en diferentes especies (Chen y Holmes, 2006; Domingo, 2006; Carrat y Flahault, 2007). La deriva antigénica del virus de influenza se produce en promedio cada dos a ocho años, en respuesta a la presión de selección, para evadir la inmunidad humana (Chen y Holmes, 2006; Domingo, 2006).

VII.3. Conclusión

Los virus son una unidad de selección (quasiespecies), con una gran capacidad de adaptación (en un lapso de tiempo muy corto) a los cambios del entorno del sistema inmune del huésped. Evaden la respuesta inmune del huésped mediante su regulación genética. Reforzando su capacidad replicativa para ser más virulentos ó co-evolucionando con el huésped infectándolo de forma persistente o latente (inserciones de secuencias entre el virus y su huésped), con un nivel bajo de replicación sin presentar signos de enfermedad. Finalmente, el objetivo principal de los virus es co-existir con su huésped para beneficio de ambos.

VII.4. Puntos clave del capítulo IV

- 1.- Una de las ideas equivocadas, es que toda infección vírica provoca una enfermedad, solo una minoría de las infecciones víricas originan síntomas o signos de enfermedad.
- 2.- En la infección persistente los virus se adaptan a su huésped con resultados epigenéticos benéficos para el huésped. Los elementos endógenos virales controlan la expresión y codificación de nuevas proteínas que pudieran ofrecer inmunidad contra de los virus.
- 3.- Los insectos y crustáceos reconocen el mRNA y lo utilizan para la inserción aleatoria de secuencias virales en su DNA, estas secuencias insertadas producen iRNA y reducen la replicación viral dentro de la célula eucariota.
- 4.- Los virus son una unidad de selección (positiva o negativa), con capacidad de adaptación al entorno proporcionado por el sistema inmune del huésped. Los virus consiguen limitar o reforzar su replicación influyendo en su patogenicidad.
- 5.- Los virus tratan de co-existir con su huésped para la sobrevivencia de ambos.

VIII. C

apítulo

V

Producción de anticuerpos
monoclonales
para conocer los cambios
evolutivos de los aminoácidos de
la proteína HA de los virus de
influenza A (H1N1)

Vega Heredia S. y Almanza Reyes H.

VIII. 1. Introducción

VIII.1. 1. ¿Qué son los anticuerpos monoclonales?

Los anticuerpos monoclonales (AcMo), son una población de anticuerpos que poseen la capacidad de reconocer moléculas específicas (antígenos). Los AcMo se producen mediante la difusión de linfocitos B con células mielomatosas (células tumorales inmortales). Los híbridos que resultan de la fusión heredan la capacidad para crecer indefinidamente en cultivo. Una vez que se logran producir, los AcMO son altamente específicos, su naturaleza y estructura se conocen a detalle, además son susceptibles de ser preparados en forma pura, en condiciones controladas y en grandes cantidades por tiempo indefinido.

VIII.1.2. Importancia y aplicación de los AcMo

Hoy en día, a nivel mundial, existe una seria preocupación de que el virus de la influenza evolucione por mutación y recombinación, y genere pandemias aún más peligrosas, que las anteriormente mencionadas. Los sitios antigénicos del virus de la influenza se encuentran en constante mutación, por lo que no son reconocidos por los anticuerpos, debido a esto, los organismos aunque estén inmunizados contra este virus, se podrían infectar y así surgiría un nuevo brote viral. Los anticuerpos monoclonales (AcMO) han revolucionado la inmunología y han tenido una repercusión considerable en muchas investigaciones como por ejemplo: El inmunodiagnostico, el desarrollo de vacunas de epítopes

conservados de los antígenos virales, el estudio de cambios evolutivos de las proteínas virales y su función.

Los AcMo se han usado para conocer los cambios evolutivos de los antígenos HA y NA de la influenza. Se realizó un estudio sobre las sustituciones de aminoácidos en las HAs de los virus de la gripe de Hong Kong de 1968, mediante el crecimiento del virus en presencia de anticuerpos monoclonales contra la HA. Esta investigación sugirió la estructura tridimensional de la HA y observaron que el sitio de unión Asn-Ser-Thr que es específico del subtipo de influenza H3N2, también se encontraba en el subtipo HA1 (Laver et al., 1980; Wiley et al., 1981; Daniels et al., 1983), al conocer la estructura tridimensional de la HA Skehel et al. (1984) identificaron la sustitución del aminoácido Asp-63 por Asn-63 de la hemaglutinina en diferentes cepas del virus de la gripe de Hong Kong de 1968. Y mediante inmunoprecipitación con extractos de células infectadas por el virus, preparados en presencia o ausencia del antiviral tunicamicina, demostraron que la inserción del aminoácido (Asn-63) bloqueaba el sitio de reconocimiento del AcMO.

La HA es el objetivo principal de neutralización para los anticuerpos, se sabe que las mutaciones se acumulan en cinco sitios de la HA1 (epítopes) (A, B, C, D y E) (Underwood, 1982; Wiley et al., 1981). Okada et al. (2010), construyeron una biblioteca de anticuerpos con 3×10^{10} clones. Aislaron los anticuerpos monoclonales que se unieron a partículas virales de 12 diferentes cepas de vacunas H3N2 de Honk Kong en los años 1968 y 2004. De 153 clones 113

mostraron unión y neutralización viral (HA anticuerpos) que fueron divididos en tres grandes grupos de acuerdo a su especificidad. 1968-1973, 1977-1993 y 1997-2003. Okada et al. (2011), localizaron los epítopes de la HA de estos clones, mediante el reconocimiento de 98 diferentes AcMO, por citometría de flujo. Los clones que neutralizaron las cepas virales de 1968-1973 tuvieron un reconocimiento antigénico en el sitio B2/D y AB1/, sin embargo los clones que neutralizaron en las cepas de 1977-1993, fueron reconocidos en los sitios B, E y principalmente C. Los clones de 1997 -2003 fueron reconocidos por AcMO en los sitios B, A/B1, A/B2 ó E/C2. Al comparar las secuencias de aminoácidos entre las cepas de 1973 y 1977 se encontraron diferentes aminoácidos en 15 residuos, en siete sitios antigénicos B1, B2, C1 y C2. Por lo que recomiendan que cuando se examine la deriva antigénica del virus de la influenza, los anticuerpos que reconocen estos sitios sean considerados, por ser dominios muy variantes. Y los anticuerpos producidos por células de memoria no combatirían a la nueva cepa viral, por lo que esta investigación concluyó que es preferible desarrollar vacunas de epítopes cuya secuencia sea altamente conservada.

En los últimos años, el subtipo de influenza H5N1 ha causado una alta morbilidad y mortalidad en poblaciones de aves de corral en Asia, Europa y África. Para prevenir este brote epidemiológico a nivel mundial se están tomando medidas preventivas como vacunarse cada año y buenos hábitos de

salud, y las medidas terapéuticas como producción de vacunas recombinantes y producción de antivirales, contra este subtipo viral.

El glicopolipéptido HA2-N es altamente conservado en todas las cepas del virus de la influenza, por lo que las vacunas dirigidas contra diversos epítopes de este péptido, tendrían un amplio espectro de inmunidad contra infecciones causadas por el virus de la influenza (Gerhard et al., 2006). Prabhu et al. (2009), caracterizaron y evaluaron la eficacia de los AcMO que se unen a los sitios conservados GLFGAIAGF de HA2, como terapia contra la influenza H5N1 en ratones. Observaron que el 50% de los ratones inmunizados con el AcMO llamado 1C9 fueron protegidos contra el H5N1y el otro 50% de los ratones lograron recuperarse de la infección. Por esto concluyeron que el AcMO 1C9 puede controlar el inicio de la infección permitiendo al animal tener una respuesta inmune efectiva. Kubota et al. (2009), mediante el mapeo de epítopes con AcMO preparados de personas vacunadas contra el virus de la influenza, identificaron epítopes muy conservados de la HA del subtipo H3N2.

La tecnología de producción anticuerpos monoclonales permite caracterizar los epítopes de los antígenos del virus de la influenza para el desarrollo de kits de diagnóstico rápido. No existen a la fecha investigaciones dirigidas al desarrollo de AcMO para el subtipo viral de influenza A (H1N1), que afectan a la población mexicana y/o sur de California (USA) (Tabla 1).

El objetivo específico de este capítulo fue producir anticuerpos monoclonales para conocer los cambios evolutivos de la proteína HA de los virus de influenza A (H1N1), para llevar a cabo este objetivo, se siguió la siguiente metodología.

VIII.2. Materiales y métodos

VIII.2.1. Obtención del inóculo del A (H1N1)

Para realizar este trabajo de investigación el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), otorgó un vial de muestra del subtipo viral A (HN1) 2009, previamente identificado al laboratorio 3 de la Facultad de Psicología y Medicina de la UABC-Tijuana. En Tijuana y Mexicali durante enero a abril del 2014, a individuos con síntomas clínicos de influenza, se les realizaron hisopados de ambas fosas nasales, utilizando hisopos.

VIII.2.2. Mantenimiento de la línea celular para la producción de AcMo

Para la producción de anticuerpos monoclonales se trabajó la línea celular P3X63Ag8.653 (Murine Myeloma). Esta línea celular fue enviada por el M.C. Aaron Rodríguez, del departamento de Biología Celular de la UNAM, al laboratorio III de la facultad de Psicología y medicina. Para evitar problemas de estrés celular al momento de descongelar, las células fueron enviadas en tubos falcon de 15 ml en medio DMEM (High Glucose w/L Glutamine w/o Sodium Pyruvate) con 5% de suero fetal bovino (SFB). Estos tubos se envolvieron en papel aluminio y se protegieron con unicel para mantener la temperatura interna estable. Antes de enviar las células se probó su viabilidad por 18 hrs en los tubos falcon, para estar seguros que sobrevivirían al envío por paquetería.

Al llegar al laboratorio 3 de la UBC-Tijuana las células no se centrifugaron, para evitar estresarlas, solo se realizó un pase a 3 frascos T25, un frasco con medio

RPME (w/ L-Glutamine) y dos frascos con medio DMEM con 10% de SFB. A los dos días se logró obtener una confluencia celular del 95%. Para amplificar las células de los frascos T25 se realizó un pase a los frascos T75 con sus respectivos medios. Después de tres días de mantener incubadas a las células a 37°C con 5% de CO₂. Se llevó a cabo la criopreservación de las células, se dejaron 5 ml de células en los frascos T25 y 13 ml en los frascos T75 para seguir amplificando la línea celular y lo demás se pasó a un tubo falcon, para centrifugar a 600 RPM/8 minutos, posteriormente se desechó el medio para solo obtener el pellet celular. A este pellet celular se le agregó 2 ml de SFB al 100% y 500 µl del agente protector dimetil-sulfóxido (DMSO) al 20% de SFB, y las células se transfirieron a crioviales, y que se congelaron por 10 minutos a -20°C en cajas de unicel cerradas (recipiente aislante), que permitió la baja de temperatura gradual, para evitar el estrés celular por el cambio drástico de temperatura. La caja de unicel cerrada se almacenó a -70°C por 24 horas, Pasadas las 24 horas los crioviales se sacaron del recipiente aislante y se almacenaron a -70°C (Fig. 2). Es recomendable, que las células se almacenen en nitrógeno (N₂₁).

VIII.2.3. Amplificación del virus de influenza A (H1N1) en embriones de pollo

El virus de influenza AH1N1 otorgado por el InDRE, se propagó en embriones de pollo. Se llevó a cabo la revisión de los embriones, que estuvieran en perfectas condiciones (huevos fértiles, venas bien formadas). Se marcó la cámara de aire, y se puncionó esta cámara, abriendo un pequeño orificio. En

este orificio se introdujo la aguja para inocular la muestra viral en la cavidad amniótica y otros 100 µl en la cavidad alantoidea. Los orificios se sellaron con pintura de uñas y se incubaron los huevos embrionados a una temperatura entre 33 a 37°C por 48 horas en atmósfera húmeda, para la multiplicación de subtipos virales A (Savón-Valdés et al., 2003) (Fig. 3).

VIII.2.4. Cosecha del virus de influenza

Después de las 48 horas los huevos embrionados se colocaron a 4°C por 4 ó 5 horas. Se abrió la cámara de aire con tijeras estériles, se rompió la membrana alantoidea con pinzas estériles y con una pipeta de 5 a 10 ml se colectó el líquido alantoideo y amniótico, este líquido se colocó en tubos eppendorf, previamente rotulados. Estos tubos se guardaron a 4°C para realizar la prueba de hemaglutinación para saber si la infección fue positiva o negativa (Savón-Valdés et al., 2003) (Fig. 3).

VIII.2.5. Prueba de la hemaglutinación

En una placa de fondo V, se colocaron 100 µl de cada una de las muestras (AH1N1pdm, H3N2 y AH1N1estacional), en los primeros pozos de la placa. Se colocaron 50 µl de PBS (0.01M) (25X) (Na_2HPO_4 y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl pH 7.2) en las columnas 2 hasta 12. Se realizaron diluciones seriadas y se agregaron 50 µl de eritrocitos de pavo al 0.5% (Solución Alsever, eritrocitos de pavo 1:100 en PBS). La placa tapada se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las placas a un ángulo de 45°C de inclinación (Manual IPK, 2003) (Fig. 1).

Mediante la extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR, se llevó a cabo la caracterización de las muestras de pacientes infectados con el virus de Influenza en Tijuana y Mexicali durante enero a abril del 2014.

VIII.2.6. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR

La extracción de RNA, se llevó a cabo del medio de transporte (Solución Hanks) del exudado faríngeo de cada paciente, con el método del TRIZOL (Tri, Sigma-Aldrich), La cuantificación del RNA se realizó con el Nanodrop (3300 Fluorospectrometer). El RT-PCR se realizó mezclando de 9 μ l de RNA (5 μ g), 1 μ l oligos dT (5 μ M), 1 μ l dNTP (10 μ M), La muestra se incubó a 85^aC y se colocó en hielo. A esta mezcla se le adicionó 2 μ l de RT buffer (10X), MgCl₂ (25 mM), DTT (0.1 M), 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l), 1 μ l enzima SuperScript III (200 U/ μ l). Las temperaturas de gradiente fueron 50 minutos a 50°C, 10 minutos a 25°C y finalmente 50 minutos a 50°C. El PCR se llevó a cabo de la siguiente manera 1 μ l de dNTP's (200 μ l/cada uno), oligonucleótidos 2 μ l pdm H1-F (5' GTGCTATAAACACCAGCCTCCCATT3') y 2 μ l pdm H1-R (5'AGACGGGAYATTCCTCAATCCTG3') (5 μ M), 2 μ l cDNA, 5 μ l Buffer 10X, 1 μ l Taq DNA Polimerasa (1U/ μ l).

VIII.3. Resultados

1.- Se obtuvieron muestras de influenza A (H1N1) de individuos con síntomas clínicos de esta enfermedad. Estas muestras se congelaron a -70°C , para posteriormente caracterizarlas.

2.- Uno de los pacientes salió positivo al subtipo viral A (H1N1)pdm (Fig. 1).

3.- La cosecha del virus de influenza A (H1N1) en embriones de pollo fue positiva, el título fue bajo 1:8 (Fig. 1), estas muestras se congelaron a -70°C . Para obtener un título más alto, se debe volver a repetir todo el procedimiento hasta conseguir el título deseado 1:512.

4.- Se logró la amplificación de la línea celular P3X63Ag8.653 (Murine Myeloma), se obtuvieron treinta crioviales, que están almacenados a -70°C .

VIII.4. Dificultades para lograr este objetivo específico

VIII.4.1 Burocracia de las instituciones

Los acuerdos, cláusulas y trámites para realizar un convenio de colaboración entre el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y la Facultad de Medicina y Psicología (FMP) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), campus Tijuana, fueron una odisea. Los trámites fueron muy complicados, tardaron aproximadamente ocho meses en concretarse. El convenio no se llevó a cabo del todo. Estos trámites se realizaron para poder obtener muestras de cada uno de los diferentes subtipos de las variantes de influenza que circulaban en México durante el 2013, A (H1N1pdm, H3N2, H7N3, H1N1 estacional, influenza B Yamagata y Victoria) ya caracterizadas, un vial de células del epitelio del riñón canino Madin-Darby (MDCK), para propagar y mantener viables a los virus, Transferencia de metodología de biología molecular, microneutralización y cultivo celular a estudiantes de maestría y doctorado de la UABC y el análisis filogenético de las secuencias obtenidas. Los estudiantes de posgrado de la UABC, nos trasladamos a la Ciudad de México para recibir la capacitación en biología molecular, microneutralización, cultivo celular y bioseguridad.

VIII.4.2. Amplificación del virus de influenza A (H1N1) en embriones de pollo

Tuvimos problemas para conseguir más embriones de pollos fértiles y certificados como libres de patógenos. El tiempo de espera para obtener estos embriones, fue de uno a dos meses.

Por falta de tiempo en mí doctorado ya no continúe en este proyecto, pero todo el trabajo realizado servirá para futuras generaciones de estudiantes de posgrado, que quieran trabajar en la realización de anticuerpos monoclonales.

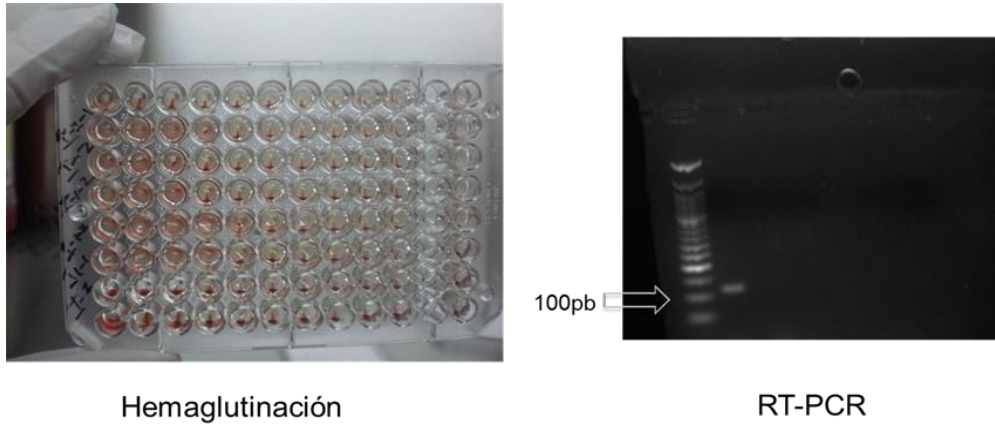
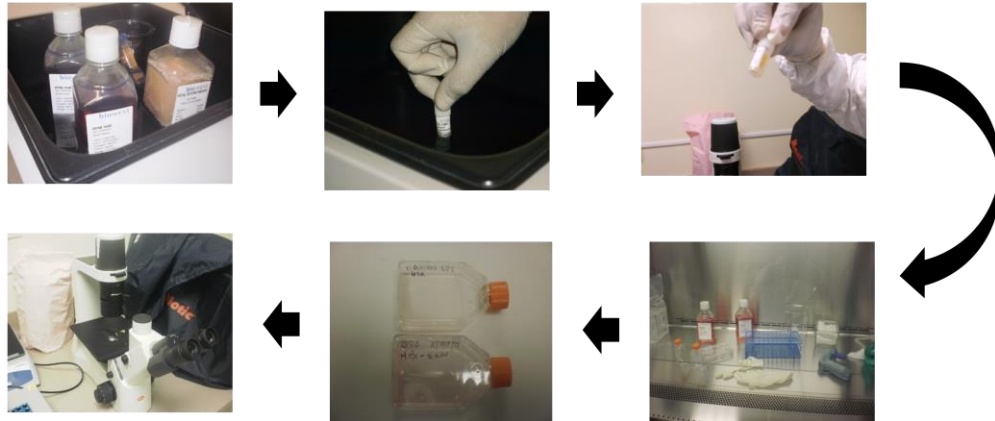
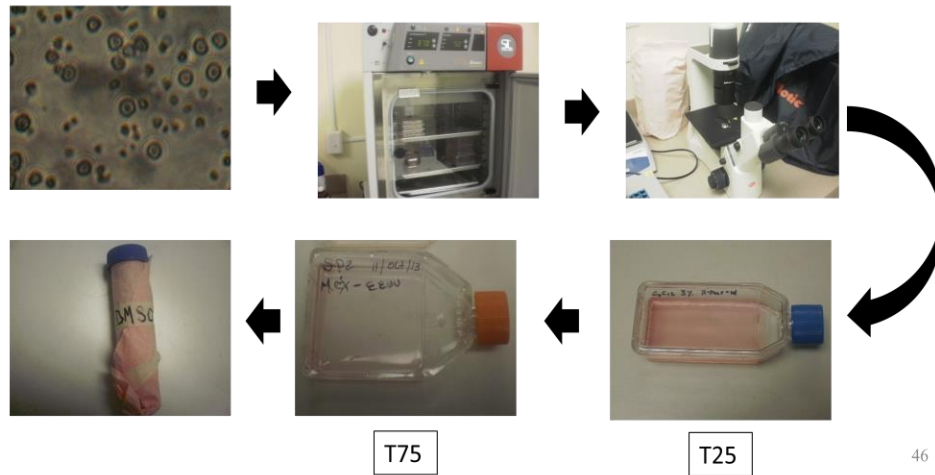


Figura 1. Diagnóstico del virus de influenza por la prueba de hemagglutinación y RT-PCR.

Amplificación por pases de las células de mieloma múltiple Ag8



Pase y criopreservación de las células del mieloma Ag8

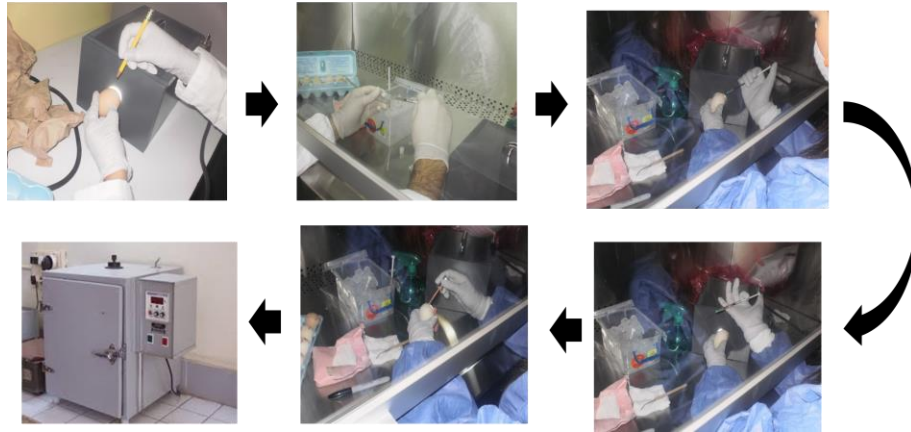


46

Figura 2. Amplificación y criopreservación de la línea celular P3X63Ag8.653

(Murine myeloma).

Inoculación de embriones de pollo con el virus de influenza



Cosecha de embriones

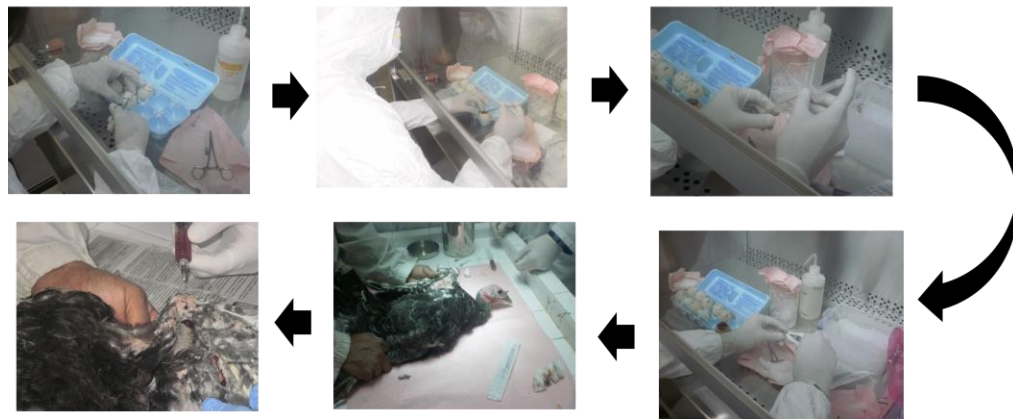


Figura 3. Inoculación y cosecha del virus de influenza A (H1N1) en embriones de pollo.

Tabla I.- Vacunas recomendadas para los subtipos de influenza A (H1N1)pdm, A (H3N2) y subtipo B durante el 2014 – 2016 (WHO ,2014-2016).

Subtipo viral	Vacunas recomendadas	Hemisferio norte	Hemisferio sur	Año
A (H1N1)pdm	A/California/7/2009	X	X	2014-2016
A (H3N2)	A/Texas/50/2012	X	X	2014-2015
A (H3N2)	A/Switzerland/9715 293/2013	X	X	2015-2016
Subtipo B	B/Massachusetts/2/ 2012	X	X	2014-15
Subtipo B	B/Phuket/3073/2013	X	X	2015-2016

VIII.6. Puntos clave del capítulo V

- 1.- Se lograron congelar a -70°C , aproximadamente 30 viales de la línea celular Sp2/0-Ag14 (hibridoma).
- 2.- El subtipo viral de influenza AH1N1, se propagó en huevos embrionados de pollo y mediante el método de hemaglutinación, se obtuvo el título 1:8.
- 3.- En muestras colectadas en Tijuana y Mexicali durante enero a abril del 2014 se detectó el subtipo viral A (H1N1)pdm
- 4.- La burocracia de las instituciones gubernamentales, limita la investigación sobre la influenza en México.

IX. Referencias

- Banda, C., 2009: The Origin and Evolution of Viruses as Molecular Organisms. Available from Nature Precedings. <http://hdl.handle.net/10101/npre>.
- Bell, T. A. y D. V. Lightner, 1984: IHHN virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* y *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 38: 185-194.
- Bell, T. A. y D. V. Lightner, 1987: IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: Effects of shrimp size on disease expression. *Journal of Fish Diseases*, 10: 165-170.
- Belyi, V. A., A. J. Levine y A. M. Skalka, 2010: Sequences from Ancestral Single-Stranded DNA Viruses in Vertebrate Genomes: the Parvoviridae and Circoviridae Are More than 40 to 50 Million Years Old. *Journal of Virology*, 84: 12458-12462.
- Belyi, V. A., A. J. Levine y A. M. Skalka, 2010: Sequences from Ancestral Single-Stranded DNA Viruses in Vertebrate Genomes: the Parvoviridae and Circoviridae Are More than 40 to 50 Million Years Old. *Journal of Virology*, 84: 12458-12462.
- Berns, K. I., 1990: Parvovirus replication. *Microbiological Reviews*, 54: 316-329.
- Bonami, J. R., B. Trumper, J. Mari, M. Brehelin y D. V. Lightner, 1990: Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*, 71: 2657-2664.
- Blackburne, B. P., A. J. Hay y R. A. Goldstein, 2008: Changing selective pressure during antigenic changes in human influenza H3. *PLoS Pathog*, 4, e1000058.
- Bloom, J. D., L. I. Gong y D. Baltimore, 2010: Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science*, 328: 1272-1275.

- Both, G. W., M. J. Sleight, N. J. Cox y A. P. Kendal, 1983: Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *Journal of Virology*, 48: 52-60.
- Bouvier, N. M. y P. Palese, 2008: The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26, Supplement 4: D49-D53.
- Boucher, Y., C. J. Douady, R. T. Papke, D. A. Walsh, M. E. R. Boudreau, C. L. Nesbø, R. J. Case y W. F. Doolittle, 2003: Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annual Review of Genetics*, 37: 283-328.
- Boyce, W. M., I. Mena, P. K. Yochem, F. M. D. Gulland, A. Garcia-Sastre, N. Moreno, D. R. Perez, A. S. Gonzalez-Reiche y B. S. Stewart, 2013: Influenza A (H1N1)pdm09 virus infection in marine mammals in California. *Emerging Microbes and Infections*, 2: e40.
- Burleigh, L. M., L. J. Calder, J. J. Skehel y D. A. Steinhauer, 2005: Influenza A virus with mutations in the M1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *Journal of Virology*, 79: 1262-1270.
- Campitelli, L., I. Donatelli, E. Foni, M. R. Castrucci, C. Fabiani, Y. Kawaoka, S. Krauss y R. G. Webster, 1997: Continued Evolution of H1N1 and H3N2 Influenza Viruses in Pigs in Italy. *Virology*, 232: 310-318.
- Cann, A. J., 2009. Principios de virología molecular, 4ta edición, editorial Acribia, S.A., España, Zaragoza. Pg. 316.
- Carrat, F. y A. Flahault, 2007: Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine*, 25: 6852-6862.
- Castelán-Vega, J. A., A. Magaña-Hernández, A. Jiménez-Alberto y R. M. Ribas-Aparicio, 2014: The hemagglutinin of the influenza A (H1N1)pdm 09 is mutating towards stability. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry : AABC*, 7: 37-44.

- Centers for disease Control and Prevention (CDC). Flu View Weekly Influenza Surveillance reports, 2011-2012: Weeks 41, 43, 48. <http://www.cdc.gov/flu/weekly>.
- Chen, Y. J., H, Z. Li, Y. Shen, H. L. Chen, K. Z. Yu, Y. Z. Bi, 2005: Molecular evolution of hemagglutinin gene of H1N1 subtype swine influenza viruses isolated from the mainland of China. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1: 13-17.
- Chen, R. y E. C. Holmes, 2006: Avian Influenza Virus Exhibits Rapid Evolutionary Dynamics. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 2336-2341.
- Cheung, T. K. y L. L. Poon, 2007: Biology of influenza virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1-25.
- Coloma, R, J. M. Valpuesta, R. Arranz, J. L. Carrascosa, J. Ortin, J. M. Benito, 2009: The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog.* 5 (6): e1000491. doi:10.1371/journal.ppat.100049.
- Cordaux, R. y M. A. Batzer, 2009: The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Reviews Genetics*, 10: 691-703.
- Couceiro, J. N., J. C. Paulson, L. G. Baum, 1993: Influenza virus strains selectively recognize sialyoligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research*, 29(2): 155- 165.
- Daniels, R. S., A. R. Douglas, J. J. Skehel y D. C. Wiley, 1983: Analyses of the antigenicity of influenza haemagglutinin at the pH optimum for virus mediated membrane fusions. *Journal of General Virology*, 64 (8): 1657-1662.
- Daniels, S. B., K. R. Peterson, L. D. Strausbaugh, M. G. Kidwell y A. Chovnick, 1990: Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. *Genetics*, 124: 339-355.
- Daubin, V. y H. Ochman, 2004: Start-up entities in the origin of new genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14: 616-619.

- Dawood, F. S., S. Jain, L. Finelli, M. W. Shaw, S. Lindstrom, R. J. Garten, L. V. Gubareva, X. Xu, C. B. Bridges, M. Uyeki, 2009: Emergence of a novel swine origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England Journal of Medicine*, 360: 2605-2615.
- De la Cruz, F. y J. Davies, 2000: Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, 8: 128-133.
- De Visser, J. A., G. M. y S. F. Elena, 2007: The evolution of sex: empirical insights into the roles of epistasis and drift. *Nature Reviews Genetics*, 8: 139-149.
- Dewannieux, M., C. Esnault y T. Heidmann, 2003: LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature Genetics*, 35: 41-48.
- Domingo E. 2006: Quasispecies: Concepts and implications for virology. Editorial Springer: Biebricher, C.K. y Eigen, M. What is a Quasispecies. Pp. 25.
- Domingo, E., J. Sheldon y C. Perales, 2012: Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76: 159-216.
- Duesberg, P. H., 1967: The RNA of influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A.* 59: 930–937.
- Dunning, H. J. C. 2011: Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends in Genetics*, 27: 157-163.
- Drummond, A. J., M. A. Suchard, D. Xie, y A. Rambaut, 2012: Bayesian phylogenetics with BEAUTI and BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969-1973.
- Eigen, M. 1993: The origin of genetic information: viruses as models. *Gene*, 135: 37-47.

- FAO (Food and Agriculture Organization). 2007. The state of world fisheries and aquaculture Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberer y L. A. Ball, 2005: Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, Ca.
- Feschotte, C. y C. Gilbert, 2012: Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nature Reviews Genetics*, 13: 283-296.
- Flegel, T., 2009: Hypothesis for heritable, anti-viral immunity in crustaceans and insects. *Biology Direct*, 4: 32.
- Garten, R. J., C. T. Davis, C. A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W. M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C. B. Smith, S. L. Emery, M. J. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf, D. F. Burke, R. A. M. Fouchier, C. Pappas, C. M. Alpuche-Aranda, H. López-Gatell, H. Olivera, I. López, C. A. Myers, D. Faix, P. J. Blair, C. Yu, K. M. Keene, P. D. Dotson, D. Boxrud, A. R. Sambol, S. H. Abid, K. S. George, T. Bannerman, A. L. Moore, D. J. Stringer, P. Blevins, G. J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, SteveWaterman, S. Smole, H. F. Guevara, E. A. Belongia, P. A. Clark, S. T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C. B. Bridges, M. Shaw, D. B. Jernigan, T. M. Uyeki, D. J. Smith, A. I. Klimov y N. J. Cox, 2009: Antigenic and Genetic Characteristics of the Early Isolates of Swine-Origin 2009 A (H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science (New York, N.Y.)*, 325: 197-201.
- Gerhard, W. K., K. Mozdzanowska y D. Zharikova, 2006: Prospectets for universal influenza virus vaccine. *Emerging Infectious Diseases* 12: 569-574.
- Gogvadze, E. y A. Buzdin, 2009: Retroelements and their impact on genome evolution and functioning. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66: 3727-3742.

- Goic, B. y M. C. Saleh, 2012: Living with the enemy: viral persistent infections from a friendly viewpoint. *Current Opinion in Microbiology*, 15: 531-537.
- Goldstein, T., I. Mena, S. J. Anthony, R. Medina, P. W. Robinson, D. J. Greig, D. P. Costa, W. I. Lipkin, A. Garcia-Sastre and W. M. Boyce, 2013: Pandemic H1N1 Influenza Isolated from Free-Ranging Northern Elephant Seals in 2010 off the Central California Coast. *PLoS ONE*, 8, e62259.
- Hay, A. 1998: The virus genome and its replication, chapter 4. In: Webster, N. K., Hay, A. Textbook of Influenza. Blackwell Science.
- Hershberger, P. K., J. L. Gregg, C. A. Grady, L. Taylor y J. R. Winton, 2010: Chronic and persistent viral hemorrhagic septicemia virus infections in Pacific herring. *Diseases of Aquatic Organisms*, 93: 43-49.
- Hoffmann, K., B. Rodriguez-Brito, M. Breitbart, D. Bangor, F. E. Angly, M. B. Oldstone, 2010: Viruses, plagues and history, Oxford University. Estados Unidos. Pg. 383.
- Holmes, E. C., 2003: Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends in Microbiology*, 11: 543-546.
- Hotopp, J. C. D., M. E. Clark, D. C. S. G. Oliveira, J. M. Foster, P. Fischer, M. C. M. Torres, J. D. Giebel, N. Kumar, N. Ishmael, S. Wang, J. Ingram, R. V. Nene, J. Shepard, J. Tomkins, S. Richards, D. J. Spiro, E. Ghedin, B. E. Slatko, H. Tettelin y J. H. Werren, 2007: Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science*, 317: 1753-1756.
- Horie, M., T. Honda, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, T. Daito, T. Oshida, K. Ikuta, P. Jern, T. Gojobori, J. M. Coffin y K. Tomonaga, 2010: Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*, 463: 84-87.
- Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster, Y. Kawaoka, 1998:

- Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of Virology*, 72: 7367-7373.
- Jenkins, G. M., A. Rambaut, O. G. Pybus y E. C. Holmes, 2002: Rates of Molecular Evolution in RNA Viruses: A Quantitative Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 54: 156-165.
- Jern, P. y J. M. Coffin, 2008: Effects of Retroviruses on Host Genome Function. *Annual Review of Genetics*, 42: 709-732.
- Jiménez-Alberto, A., E. Alvarado-Facundo, R. M. Ribas-Aparicio y J. A. Castelán-Vega, 2013: Analysis of Adaptation Mutants in the Hemagglutinin of the Influenza A (H1N1)pdm09 Virus. *PLoS ONE*, 8, e70005.
- Kalagayan, G., D. Godin, R. Kanna, G. Hagino, J. Sweeney, J. Wyban y J. Brock, 1991. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22: 235-43.
- Kazazian, H. H., 2004: Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*, 303: 1626-1632.
- Khandaker, I., A. T. Suzuki., K. Kamigaki., T. Tohma, T. Odagiri, A. Okada, K. Ohno, R. Otani, K. Sawayama, M. Kawamura y H. Oshitani, 2013: Molecular evolution of the hemagglutinin and neuraminidase genes of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses in Sendai, Japan, during 2009–2011. *Virus Genes*, 47: 456-466.
- Keeling, P. J. y J. D. Palmer, 2008: Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9: 605-618.
- Kimura, M. 1983: The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University, *Press. Cambridge*
- Klein, E. Y., A. W. R. Serohijos, J. M. Choi, E. I. Shakhnovich y A. Pecosz, 2014: Influenza A H1N1 Pandemic Strain Evolution – Divergence and the Potential for Antigenic Drift Variants. *PLoS ONE*, 9, e93632.

- Koonin, E. V. y V. V. Dolja, 2013: A virocentric perspective on the evolution of life. *Current Opinion in Virology*, 3: 546-557.
- Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi y K. I. Berns, 1990: Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 2211-2215.
- Kubota-Koketsu, R., H. Mizuta, M. Oshita., S. Ideno., Y. Yunoki., M. Kuhara, N. Yamamoto, Y. Okuno y K. Ikuta, 2009: Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 387: 180-185.
- Kuntz-Simon, G. y F. Madec, 2009: Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses and Public Health*, 56: 310-325.
- Labreuche, Y. y G. W. Warr, 2013: Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 1002-1010.
- Lamb, R. A. y R. M. Krug, 2001: Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology Vol 1*. Fourth edition Knipe D.M. y Howley P, M., Eds: 1487-1531. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- La Fauce, K. A. y L. Owens, 2012: RNA interference reduces PmergDNV expression and replication in an in vivo cricket model. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100: 111-115.
- Laver, W. G., G. M. Air, C. W. Ward, T. A. Dopheide, 1980: Amino acid sequences changes in the haemagglutinin of a Hong Kong H3N2 influenza virus during the period 1968-1977. *Nature*, 283: 454-457.
- Laver, W. G., P. M. Colman y R. G. Webster 1984: Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity. *Virology*. 137: 314-323.
- Lee, J. S., M. Y. E. Chowdhury, H. J. Moon, Y. K. Choi, M. R. Talactac, J. H. Kim, M. E. Park, H. Y. Son, K. S. Shin y C. J. Kim, 2013: The highly

- conserved HA2 protein of the influenza A virus induces a cross protective immune response. *Journal of Virological Methods*, 194: 280-288.
- Levin, H. L. y J. V. Moran, 2011: Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews Genetics*, 12: 615-627.
- Li, X. y P. Palese, 1994: Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *Journal of Virology* 68 (2): 1245-1249.
- Librado, P. y J. Rozas, 2009: DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451-1452.
- Lightner, D. V., M. Redman y A. Bell, 1983: Infectious Hipodermal and Hematopoietic Necrosis, a Newly Recognized Virus Disease of Penaeid Shrimp. *Journal of invertebrate pathology*, 42: 62-70.
- Lightner, D. V. 1988: Diseases of cultured penaeid shrimp. En: Sindermann, C. y D. Lightner (Ed.). Disease, diagnosis and control in North American Marine Aquaculture. Series: Developments in aquaculture and Fisheries Science 17. 432pp.
- Lightner, D. V. 1996: Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique Technique*, 15: 579-601.
- Lightner, D. V., 2011: Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 110-130.
- Liu, H., Y. Fu, J. Xie, J. Cheng, S. A. Ghabrial, G. Li, Y. Peng, X. Yi y D. Jiang, 2011: Widespread Endogenization of Densoviruses and Parvoviruses in Animal and Human Genomes. *Journal of Virology*, 85: 9863-9876.
- Martinez-Cordova, L. R., D. Voltolina, J. A. López-Elias, E. Palacios, L. S. Racotta, J. Vélez, J. R. Bonami, G. Yepiz-Plascencia, L. E. Gutiérrez Millán, E. Villalpando Canchola y M. L. Unzueta-Bustamante, 2002. Camaronicultura Avances y Tendencias, Editorial GT Editor S. A., México. pp. 167.

- Martin, D. P., P. Lemey, M. Lott, V. Moulton, D. Posaday y P. Lefevre, 2010, RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26: 2462-2463.
- McHardy, A. C. y B. Adams, 2009: The Role of Genomics in Tracking the Evolution of Influenza A Virus. *PLoS Pathogen*, 5, e1000566.
- Morales-Covarrubias, M. S., L. M. Nunan, D. V. Lightner, J. C. Mota-Urbina, M. C. Garza-Aguirre y M. C. Chávez-Sánchez, 1999: Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the northern Gulf of California. Mexico. *Journal Aquatic Animal Health*, 11: 296-301.
- Moran, J. V., S. E. Holmes, T. P. Naas, R. J. DeBerardinis, J. D. Boeke y H. H. Kazazian Jr, 1996: High Frequency Retrotransposition in Cultured Mammalian Cells. *Cell*, 87: 917-927.
- Moya, A., E. C. Holmes y F. Gonzalez-Candelas, 2004: The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 279-288.
- Motte, E., E., J. Yugcha, F. Luzardo, G. Castro, J. Leclercq, P. Rodriguez, O. Miranda, J. Borja, M. Serrano, K. Terreros, A. Montalvo, N. Narváez, V. Tenorio, E. Cedeño, Mialhe y V. Boulo, 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219: 57-70.
- Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou y S. Barman, 2009: Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*, 143: 147-161.
- Nelson, M., D. Spiro, D. Wentworth, J. Fan, E. Beck, K. S. t. George, E. Ghedin, R. Halpin, J. Bera, E. Hine, K. Proudfoot, T. Stockwell, X. Lin, S. Griesemer, M. Bose, L. Jurgens, S. Kumar, C. Viboud, E. Holmes y K. Henrickson, 2009: The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Currents*, 1, RRN1126.
- Neumann, G., T. Noda y Y. Kawaoka, 2009: Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459: 931-939.

- Noreen, F., R. Akbergenov, T. Hohn y K. R. Richert-Pöggeler, 2007: Distinct expression of endogenous Petunia vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two Petunia hybrida lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production. *The Plant Journal*, 50: 219-229.7.
- Nunan, L. M., B. T. Poulos y D. V. Lightner, 2000: Use of Polymerase Chain Reaction for the Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Penaeid Shrimp. *Marine Biotechnology*, 2: 319-328.
- Ohta, T. 1992: The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic*, 23: 263-286.
- Okada, J., N. Ohshima., R. Kubota-Koketsu., S. Ota., W. Takase., M. Azuma., Y. Iba., N. Nakagawa., T. Yoshikawa., Y. Nakajima., T. Ishikawa., Y. Asano., Y. Okuno y Y. Kurosawa, 2010: Monoclonal antibodies in man that neutralized H3N2 influenza viruses were classified into three groups with distinct strain specificity: 1968-1973, 1977-1993 and 1997-2003. *Virology*, 397 (2): 322-330.
- Okada J., N. Ohshima., R. Kubota-Koketsu., Y. Iba., S. Ota., W. Takase., T. Yoshikawa., T. Ishikawa., Y. Asano., Y. Okuno y Y. Kurosawa, 2011. Localization of epitopes recognizaed by monoclonal antibodies that neutralized the H3N2 influenza viruses in man. *Journal of General Virology*, 92: 326-335.
- Ostertag, E. M., J. L. Goodier, Y. Zhang y H. H. Kazazian, Jr., 2003: SVA Elements Are Nonautonomous Retrotransposons that Cause Disease in Humans. *The American Journal of Human Genetics*, 73: 1444-1451.
- Owens, L., I. G., Anderson, M. Kenway, L. Trott y A. H. Benzie, 1992: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14: 219-228.
- Posada, D., 2009: Bioinformatics for DNA sequence Analysis. Editorial Humana Press, Spain. Pp 350.

- Prabhu, N., M. Prabakaran., H. Ho., S. Velumani., J. Qiang., M. Goutama y J. Kwang, 2009: Monoclonal antibodies against the fusion peptide of hemagglutinin protect mice from lethal influenza A virus H5N1 infection. *Journal of Virology*, 83 (6): 2553-2562.
- Primavera, H. y E. T. Qunitio, 2000: Runt deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology*, 20: 796-802.
- Qi, Z. H., J. Feng y C. C. Liu, 2014: Evolution trends of the 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses in different continents from March 2009 to April 2012. *Biologia*, 69: 407-418.
- Rivera- García, M. y J. M. Grijalva-Chon, 2006: Variabilidad y diferenciación genética en camarón blanco *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* de bajo y alto crecimiento. *Ciencias Marinas*, 32 (1A): 1-11.
- Roberts, P. C., R. A. Lamb y R. W. Compans, 1998: The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinant in filamentous particle formation. *Virology*, 240: 127-137.
- Robles-Sikisaka, R., A. J. Bohonak, L. R. McClenaghan y A. K. Dhar, 2010: Genetic signature of rapid IHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) expansion in wild *Penaeus* shrimp populations. *Plos One*, 5(7): e11799. doi:10.1371/journal.pone.0011799.
- Roossinck, M. J., 2011: The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 99-108.
- Saksmerprome, V., S. Jitrakorn, K. Chayaburakul, S. Laiphrom, K. Boonsua y T. W. Flegel, 2011: Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Research*, 160: 180-190.
- Schröder, A. R. W., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker y F. Bushman. 2002: HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell*, 110: 521-529.
- Savón-Valdés, C., A. Goyenechea-Hernández, S. Oropesa-Fernández, O. Valdés Ramírez, E. Acosta-Herrera, G. González-Muñoz, L. Pérez-Santos,

- L. Parlem-Caraballo y A. Piñon-Ramos, 2003: Manual de procedimientos de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Instituto de Medicina Tropical, Pedro Kouri.
- Skehel, J. J., D. J. Stevens., R. S. Daniels., A. R. Douglas., M. Knossowtt., I. A. Wilsons y D. C. .Wiley, 1984: A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proceedings of the National of Academy of Sciences, USA*. 81: 1779-1783.
- Smith, D. J., A. S. Lapedes, J. C. de Jong, T. M. Bestebroer, G. F. Rimmelzwaan, A. D. M. E. Osterhaus y R. A. M. Fouchier, 2004: Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza Virus. *Science*, 305: 371-376.
- Smith, G. J. D., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghvani, S. Bhatt, J. S. M. Peiris, Y. Guan y A. Rambaut, 2009: Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459: 1122-1125.
- Stephen, L., G. Rebecca, B. Amanda, S. Bo, E. Shannon, B. LaShondra, B. Nathelia, S. Katrina, G. Larisa, V. Julie y K. Alexander, 2012: Human Infections with Novel Reassortant Influenza A(H3N2)v Viruses, United States, 2011. *Emerging Infectious Disease journal*, 18: 834.
- Stouthamer, R., J. A. J. Breeuwer y G. D. D. Hurst, 1999: *Wolbachia pipentis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53: 71-102.
- Tang, K. F. J. y D. V. Lightner, 2006: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Research*, 118: 185-191.
- Taubenberger, J. K. y J. C. Kash, 2010: Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell host & microbe*, 7: 440-451.

- Tavira-Montalván, C. A., A. Ortega Garcia, I. Davila-González, S. Estrada Mondaca y A. Meneses-Acosta, 2009: Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 40 (4): 35-46.
- Trifonov, V., H. Khiabanián y R. Rabadan, 2009: Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *New England Journal of Medicine*, 361: 115-119.
- Tong, S., Y. Li, P. Rivaller, C. Conrardy, D. A. A. Castillo, L. M. Chen, S. Recuenco, J. A. Ellison, C. T. Davis, I. A. York, A. S. Turmelle, D. Moran, S. Rogers, M. Shi, Y. Tao, M. R. Weil, K. Tang, L. A. Rowe, S. Sammons, X. Xu, M. Frace, K. A. Lindblade, N. J. Cox, L. J. Anderson, C. E. Rupprecht y R. O. Donis, 2012: A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 4269-4274.
- Vega-Heredia, S., F. Mendoza-Cano y A. Sánchez-Paz, 2012: The Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus: A Brief Review of What We Do and Do Not Know. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59: 95-105.
- Venter, M., D. Naidoo, M. Pretorius, A. Buys, J. McAnerney, L. Blumberg, S. A. Madhi, C. Cohen y B. Schoub, 2012: Evolutionary Dynamics of 2009 Pandemic Influenza A Virus Subtype H1N1 in South Africa During 2009–2010. *Journal of Infectious Diseases*, 206: S166-S172.
- Wang, P. H., T. Huang, X. Zhang y J. G. He, 2014: Antiviral defense in shrimp: From innate immunity to viral infection. *Antiviral Research*, 108: 129-141.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers y Y. Kawaoka, 1992: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56: 152-179.
- Weinbauer, M. G., 2004: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 127-181.

- Wilks, S., M. de Graaf, D. J. Smith y D. F. Burke, 2012: A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. *Vaccine*, 30: 4369-4376.
- Wiley, D. C., I. A. Wilson y J. J. Skehel, 1981: Structural identification of the antibody binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*, 289: 373-378.
- Withyachumnarnkul, B., K. Chayaburakul, S. Lao-Aroon, P. Plodpai, K. Sritunyalucksana y G. Nash, 2006: Low impact of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on growth and reproductive performance of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69: 129-136.
- World Health Organization (Who). 2007. Weekly Epidemiological Record (WER). WHO 15 October 2007. 40(82): 345-358.
- World Health Organization (Who). 2012. Influenza Centre London. February 2012. Interim Report, Report Prepared for the WHO Annual Consultation on the Composition of influenza Vaccine for the Northern Hemisphere.
- World Health Organization (WHO). 2013. Review of the 2012-2013 winter influenza season, northern hemisphere. WKLY. Epidemiol. Rec. 88. 225-232.
- World Health Organization (Who). 2014-2016. Consultation and information meeting on the composition of Influenza Virus vaccines for the Northern and Southern Hemisphere. www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/consultation201502/en/
- Wu, X., Y. Li, B. Crise y S. M. Burgess, 2003: Transcription Start Regions in the Human Genome Are Favored Targets for MLV Integration. *Science*, 300: 1749-1751.
- Yuan, J. B., X. J. Zhang, C. Z. Liu, J. K. Wei, F. H. Li y J. H. Xiang, 2013: Horizontally transferred genes in the genome of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 165.

Anexo I. Secuencias de nucleótidos del virus de la influenza A (H1N1) del gen completo de HA del GenBank.

Código GenBank	Nombre del gen	Huésped	Origen de la variante	Referencia
CY020293.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Brazil, 1978	Ghedin,E. et al. 2007
AY289927.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 1991	Lee,M.S. et al. 2003
AY289928.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	China, 1995	Lee,M.S. et al. 2003
CY125068.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Sudáfrica, 1997	Wentworth,D.E. et al. 2012
CY125663.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Inglaterra, 2000	Wentworth,D.E. et al. 2012
DQ397950.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Japon, 2001	Uda,T. et al. 2006
EU516329.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	China, 2002	Ngai,K.L.K. et al. 2008
EU199348.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2006	Garten,R. 2008
EU100708.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2007	Garten,R. 2008
FJ445073.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Inglaterra, 2006	Galiano,M. 2008
FJ445044.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Inglaterra, 2007	Galiano,M. 2009
EU199354.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2007	Garten,R. 2008
EU199286.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2007	Garten,R. 2009
FJ743471.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Camboya, 2007	Hurt,A.C. et al 2007
FJ532076.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2008	Garten,R. 2008
AB501383.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Tailandia, 2008	Bai,G.R. et al. 2009
HQ291893.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	China, 2008	Yang,J.R et al. 2011
FJ743464.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Africa, 2008	Hurt,A.C. et al. 2009
FJ445028.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Inglaterra, 2008	Galiano,M.2008
CY073960.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2008	Contreras-Trevino,H.I. et al. 2011
CY073953.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2008	Contreras-Trevino,H.I. et al. 2011
CY073935.1	Influenza A virus	Humano	México, 2008	Contreras-Trevino,H.I. et al.

	(H1N1)			2011
CY147811.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E. et al. 2013
CY147955.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E. et al. 2013
CY147691.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E. et al. 2013
CY147603.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E. et al. 2013
CY147587.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E. et al. 2013
CY147542.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E. et al. 2013
GQ379822.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Alpuche-Aranda,C.M. et al. 2009
GQ303340.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Alpuche-Aranda,C.M. et al. 2009+G64
GQ339881.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Garten,R. 2009
GQ162202.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Garten,R.J. et al. 2009
GQ162200.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Garten,R.J. et al. 2009
GQ162195.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Garten,R.J. et al. 2009
GQ162194.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Garten,R.J. et al. 2009
GQ162183.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2008	Garten,R.J. et al. 2009
GQ162172.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Garten,R.J. et al. 2009
KC261318.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Vazquez-Perez,J.A. et al 2013
CY100488.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Isa,P. Et al. 2012
CY100472.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Isa,P. Et al. 2013
CY147923.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147907.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147899.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147883.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147875.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147867.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013

CY147859.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147851.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY106568.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2012
CY147947.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147939.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147843.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147803.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147787.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147779.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147739.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147731.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147699.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
CY147675.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Wentworth,D.E.et al. 2013
GQ402189.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Bastien,N. et al. 2009
CY097876.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Houng,H.-S.H. et al. 2011
CY083487.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Houng,H.-S.H. et al. 2011
CY083447.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Houng,H.-S.H. et al. 2011
CY054296.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Zepeda-Lopez,H.M. et al 2010
CY064708.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Spiro,D. et al. 2012
CY062635.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Spiro,D. et al. 2012
CY050887.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Spiro,D. et al. 2012
CY050871.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Spiro,D. et al. 2012
CY050254.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Spiro,D. et al. 2012
CY050246.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Spiro,D. et al. 2012
CY050198.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2009	Spiro,D. et al. 2012

GQ457517.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2009	Shu,B. et al. 2009
AB558308.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Japon, 2009	Furuse,Y. et al. 2010
CY083805.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	España, 2009	Spiro,D. et al. 2011
GQ166661.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Inglaterra, 2009	Baillie,G.J. et al. 2011
CY120763.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Brasil, 2009	Wentworth,D.E. et al. 2012
HM569659.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Argentina, 2009	Fedorova,N. et al. 2012
CY120024.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Ortiz-Alcantara,J. et al. 2012
KC261320.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Vazquez-Perez,J.A. et al. 2013
CY073126.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Houng,H.-S. et al. 2010
KC261321.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Vazquez-Perez,J.A. et al. 2012
CY100514.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Isa,P. et al.2011
CY100530.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Isa,P. et al.2011
CY083535.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Houng,H.-S.H. et al. 2011
CY097964.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2010	Houng,H.-S.H. et al. 2011
KC882117.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2010	Klimov,A. et al. 2013
KF918703.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	China, 2010	Sun,Y. et al. 2013
KF860846.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	España, 2010	Garcia-Barreno,B. et al. 2013
JX625630.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Inglaterra, 2010	Galiano,M.C. et al. 2012
HQ595297.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Brasil, 2010	Ferreira,J.L. et al. 2011
AB551883.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Japón, 2010	Kawano,H. et al. 2010
CY116642.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2011	Gonzalez Duran,E. et al. 2012
CY089856.2	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2011	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2011
CY089854.2	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2011	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2011
CY089391.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2011	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2011
CY089389.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2011	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2011

KC891414.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2011	Klimov,A. et al. 2013
AB745408.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Japón, 2011	Tsuneki,A. et al. 2013
JN561789.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	China, 2011	Yu,X.2011
CY129734.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	España, 2011	Wentworth,D.E. et al. 2012
CY120755.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Brasil, 2011	Wentworth,D.E. et al. 2012
CY110745.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2012
CY110743.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2012
CY120058.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2012
CY120054.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2012
CY120052.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2012
CY120056.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	Ramirez-Gonzalez,J.E. et al. 2012
JQ714074.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	de la Rosa-Zamboni,D. et al. 2012
JQ714073.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	México, 2012	de la Rosa-Zamboni,D. et al. 2012
KC891516.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2012	Klimov,A. et al. 2013
CY135172.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	China, 2012	Liang,L. et al. 2013
KC291184.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Brasil, 2012	Borborema,S.E.T. et al. 2012
KF648198.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2013	Barnes,J. et al. 2013
CY163415.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Japón, 2013	Connors,B.C. et al. 2013
KF648272.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2013	Barnes,J. et al. 2013
KJ138418.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	China,2013	Wan,Y. 2014
KF151219.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Brasil, 2013	Paiva,T.M. et al. 2013
CY187215.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2014	Connors,B.C. et al. 2014
FJ966974.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Estados Unidos, 2009	Garten,R.J. et al. 2009
EU798784.1	Influenza A virus (H1N2)	Cerdo	Corea, 2006	Pascua,P.N. et al. 2008
CY027155.1	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	Estados Unidos, 1991	Spiro,D. et al. 2007

EU798779.1	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	Corea, 2005	Choi,Y.-K. et al. 2008
CY038023.1	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	Dinamarca, 1993	Dunham,E.J. et al. 2009
FJ415610.1	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	China,2007	Zhang,P.C. et al. 2008
EU100724.1	Influenza A virus (H1N1)	Humano	Islas Salomón, 2006	Garten,R. et al. 2007
EU026102.2	Influenza A virus (H1N1)	Pato	Estados Unidos, 1994	Kim,L.M. et al. 2007
HQ840327.1	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	Estados Unidos, 2009	Garten,R. et al. 2011
CY122357.2	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	México, 2010	Sanchez-Betancourt,J.-I. et al. 2013
CY160244.1	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	México, 2011	Wentworth,D.E. et al. 2013
KJ801511.1	Influenza A virus (H1N1)	Cerdo	Estados Unidos, 2014	Culhane,M. 2014
FN386464.1	Influenza A virus (H1N1)	Anas crecca	España, 2007	Busquets,N. et al. 2009