

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA



TÍTULO.

**“SEROPREVALENCIA DE DISTINTOS SUBTIPOS DEL VIRUS
DE LA INFLUENZA A Y B EN BAJA CALIFORNIA”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

CARLOS ALFREDO COTA HAROS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ

TIJUANA, B.C., MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2016

Tijuana Baja California, a 19 de septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Presidente en el examen de la Tesis titulada **“SEROPREVALENCIA DE DISTINTOS SUBTIPOS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A Y B EN BAJA CALIFORNIA”** elaborada por el C. **Carlos Alfredo Cota Haros**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

Presidente

Tijuana Baja California, a 19 de septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal en el examen de la Tesis titulada **“SEROPREVALENCIA DE DISTINTOS SUBTIPOS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A Y B EN BAJA CALIFORNIA”** elaborada por el C. **Carlos Alfredo Cota Haros**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

Sinodal

Tijuana Baja California, a 19 de septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Secretario en el examen de la Tesis titulada **“SEROPREVALENCIA DE DISTINTOS SUBTIPOS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A Y B EN BAJA CALIFORNIA”** elaborada por el C. **Carlos Alfredo Cota Haros**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

Secretario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA



TÍTULO.

**“SEROPREVALENCIA DE DISTINTOS SUBTIPOS DEL VIRUS
DE LA INFLUENZA A Y B EN BAJA CALIFORNIA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

CARLOS ALFREDO COTA HAROS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ

TIJUANA, B.C., MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2016

I. DEDICATORIA

Quiero dedicarles esta tesis a mis padres, hermanos, esposa y toda mi familia, a mis tíos, tías y primos, quienes han estado siempre ahí para apoyarme en lo que necesite. Tracen sus metas, fijen su camino y no duden que lo van a lograr, una vez que lleguen ahí, se darán cuenta que nada es inalcanzable y que van por más.

Una especial dedicatoria a mí querida abuela Yolanda Duarte a quien admiro y quiero mucho. Ella siempre me alienta a seguir adelante, esta tesis te la dedico abue!!!.

II. AGRADECIMIENTOS

Durante esta travesía he compartido con mis seres queridos desvelos, estrés, alegrías y de más. También he conocido grandes personas y grandes investigadores que trazan sus metas y sin importar el trabajo que hay que realizar, llegan hasta ahí. Por eso...

Quiero ofrecer un cordial agradecimiento a mi Tutor y amigo el Dr. Horacio Almanza Reyes. Gracias a Horacio supere todas las adversidades del proyecto, especialmente en la parte experimental de este proyecto. Te agradezco todo el conocimiento que me brindaste para el desarrollo de este proyecto y que al final se concluye en esta tesis y en una bonita amistad.

Al personal del laboratorio de virus respiratorio del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia epidemiológica, por haberme brindado las cepas para la realización de este proyecto. Un gradecimiento especial a: Carlos y Naty por haberme capacitado en el manejo del virus tanto en cultivo celular como en embrión de pollo

Otra persona que no me puede faltar es mi amigo, compañero y colega, Mtro. José Román Chávez, Una persona realmente admirable en todos los aspectos, que si se propone algo lo logra. Te agradezco todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio. Si tu apoyo no estaría aquí.

A mi familia, mis padres Carlos Cota y a mi madre Elvia Haros Encinas, a mi segunda madre Migadalia Haros Encinas, a mi hermana Stephanie Cota Haros y a mi hermano menor Omar Adrián Cota Haros, A todos ellos les agradezco todo lo que soy, Los amo y son un pilar importante en mi vida.

También agradezco mis compañeros de maestría: Carolina, Eva, Judith, Miguel, Francisco, primero que nada por su amistad y por ser las grandes personas y profesionistas que son, los admiro. Soy afortunado de haberlos

conocido. Por las grandes aportaciones que realizaron a este proyecto en cada clase.

A mis maestros: Dr. Rufino Menchaca, Dra. Ana Valles, al Dr. Miguel Alberto Zamudio† que me guiaron durante el camino, para el desarrollo del proyecto.

Al final, sin embargo no la menos importante a mi Amada Esposa, amiga, confidente Carolina Carrión Chávez que definitivamente es un pilar muy importante en vida. Contigo he compartido todo, trabajo, escuela, viajes, tareas, la casa. Te agradezco infinitamente tu paciencia y apoyo que me has brindado siempre. Te amo mucho!!!!

III. ABREVIATURAS

A.C	Antes de cristo
ARN	Ácido ribonucleico
CEE	Chicken embryo eggs
Células Caco-2	Células de adenocarcinoma de colon humano
CRM1	Receptor de exportación nuclear
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
HA	Hemaglutinina
IFN	Interferón
IH	Inhibición de la hemaglutinación
IRF3	Factor regulador de interferón 3
IRF7	Factor regulador de interferón 7
Jun/ATF2	Gen Jun/Activación del factor de transcripción 2
M	Matriz
M1	Proteína matriz 1
M2	Proteína transmembranal
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mRNA	Ácido ribonucleico-mensajero
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína exportadora nuclear
NFκB	Complejo de proteínas que regulan la transcripción del DNA
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Polimerasa A
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony)
PB1	Polimerasa Base 1
PB1-F2	Proteína PB1-F2

PB2	Polimerasa Base 2
PKR	Proteína kinasa R
Pollos SPF	Pollos libres de patógenos específicos
RDE	Enzima destructora de receptores
RNAP II	RNA polimerasa II
RNPs	Ribonucleoproteínas
RT-PCR	Real time- Protein Chain Reaction
USA	United states of America
vRNA	Ácido ribonucleico viral

IV. RESUMEN

La infección respiratoria aguda causada por el virus de la influenza es un problema de salud pública que causa la muerte de alrededor de 10 a 15 mil personas en el mundo, y anualmente causan un estimado de 200,000-500,000 hospitalizaciones. Las variaciones genéticas del virus son unos de los principales desafíos que enfrenta la prevención de la infección con el virus de la influenza. Las pandemias y los brotes epidémicos anuales se producen como consecuencia de la variación de los antígenos de la Hemaglutinina (HA) y posiblemente también de la neuraminidasa (NA). La gripe pandémica fue consecuencia de variaciones mayores o sustituciones antigénicas, que implicaron la aparición de un nuevo subtipo de virus de la influenza A en la población. Por otra parte los brotes epidémicos anuales son producidos por virus del mismo subtipo que presentan variaciones menores, caracterizadas por la acumulación de cambios de aminoácidos, fundamentalmente en la HA, que dificultarán la unión a los anticuerpos, lo que les permitirá evadir la respuesta inmunitaria. La mejor estrategia para combatir al virus de la influenza, es realizando monitoreos (vigilancia) para entender su dinámica evolutiva. Este conocimiento nos daría información sobre la cepa que está surgiendo, para poder producir una vacuna oportuna y un buen control epidemiológico. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevos métodos de seroprevalencia del virus influenza en nuestra región. En este proyecto se realizó un estudio de corte transversal, analítico que se llevó a cabo en el laboratorio 3 de la Facultad de Medicina y Psicología campus Tijuana, para determinar la prevalencia de los títulos de anticuerpos contra los subtipos del virus influenza AH1N1 pandémico (pdm), Influenza B Yamagata e Influenza B Victoria en personas que residían en el estado de Baja California. Los virus fueron amplificados en campana de flujo laminar según protocolo descrito por la OMS en el "Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza", el aislamiento de los diferentes subtipos de virus influenza se obtuvieron en embrión de huevo, posteriormente se realizaron los experimentos para titular el virus por Hemaglutinación y se estandarizaron los métodos de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y las técnicas de cultivo celular con células MDCK. Una vez

teniendo a punto las diferentes metodologías se realizaron la toma de muestras de los voluntarios previos autorización por escrito y se realizaron las pruebas de hemadsorción de los sueros problema, tomando como positivos aquellos sueros que presentaron una aglutinación en un título 1:20. Para este estudio se reclutaron 386 participantes; el promedio de edad fue de 22.1 años (DE=9.08); evaluamos si los participantes habían recibido la vacuna contra el virus de influenza y se encontró que solo el 35% la había recibido; se les preguntó si habían tenido un diagnóstico previo de infección por el virus de influenza, se encontró que el 4.4% había tenido una infección previa. La seroprevalencia encontrada fue del 39.4% del subtipo A H1N1pdm, 1.81% del subtipo B Victoria y 7.25% del subtipo B Yamagata. El análisis bivariado mostro que para los virus A H1N1 pdm y B Yamagata se encontró que los participantes que tuvieron un titulo >1:40, presentaban mayor probabilidad de haber sido vacunados. Para el análisis del subtipo B Victoria no se obtuvieron factores asociados a las variables utilizadas en este modelo.

V. ÍNDICE

.....	1
I. DEDICATORIA.....	6
II. AGRADECIMIENTOS.....	7
III. ABREVIATURAS	9
IV. RESUMEN.....	11
V. ÍNDICE.....	13
VIII. INDICE DE TABLAS.	17
VII. INDICE DE FIGURAS.....	17
VIII. INDICE DE GRÁFICAS.	17
CAPÍTULO I	19
1.1.Introducción	19
CAPÍTULO II	22
2.1Antecedentes	22
2.1.1. Historia de la gripe humana.....	22
2.1.2. Clasificación de la influenza y nomenclatura	27
2.1.3. La partícula viral	28
2.1.4. Características de las proteínas virales	30
2.1.5. El genoma viral.....	33
2.1.6. El ciclo de infección del virus influenza.....	35
2.1.6.1. Entrada de las partículas virales.....	35
2.1.6.2. Iniciación y elongación de los mRNAs virales.....	36
2.1.6.3. <i>Splicing</i> de mRNAs virales	38
2.1.6.4. Poliadenilación de los mRNAs virales.....	38
2.1.6.5. Traducción de proteínas virales.....	39
2.1.6.6. La replicación viral.....	39
2.1.6.7. Transcripción secundaria.....	40
2.1.6.8. Ensamblaje de los viriones y liberación	40
2.1.7. Variaciones menores del virus influenza (“DRIFT”) que producen la gripe estacional.....	42

2.1.8. Variaciones mayores del virus influenza(“SHIFT”) que producen la gripe pandémica	44
2.1.9. Reordenamiento o reagrupamiento génico	45
2.1.10. Transmisión directa	46
2.1.11. Patogenia de la enfermedad.....	47
2.1.12. Complicaciones de la influenza humana.....	48
2.1.13. Tratamiento de la gripe.....	48
2.1.13.1. Antivirales Inhibidores de la proteína M2	48
2.1.13.2. Antivirales Inhibidores de la proteína Neuraminidasa	48
2.1.14. Vacunas	49
2.2. Justificación y uso de los resultados.....	49
2.3. Pregunta de investigación.....	50
2.4. OBJETIVOS.....	50
2.4.1.Objetivo general	50
2.4.2. Objetivos específicos.....	50
CAPÍTULO III.	50
3.1. Población de estudio	50
3.1.1. Selección de la Muestra	50
3.1.2.....Variables	51
3.1.3.....Reclutamiento de los candidatos	52
3.1.4. Cuestionario demográfico.....	52
3.1.5. Diseño del estudio	52
3.1.6. Criterios de inclusión	53
3.1.7. Criterios de exclusión	53
3.1.8. Reclutamiento de los participantes	53
3.1.9. Cuestionario demográfico.....	53
3.2. Metodología.....	54
3.2.1. Medidas de seguridad y limpieza previa a manipulación del virus de influenza .	54
3.2.2. Aislamiento del virus de influenza en embrión de huevo	54
3.2.3 Examinación de los embriones	54
3.2.4. Inoculación de los embriones	55
3.2.5. Incubación de los embriones	56

3.2.6. Cosecha del virus	56
3.3 Preparación de soluciones	57
3.3.1. Solución amortiguada por fosfato –PBS- (0.01 M, PH 7.2)	57
3.3.2. Solución de Alsever	57
3.3.4. Tratamiento de sueros problema	58
3.3.5. Remoción de aglutininas no específicas.....	59
3.3.6. Medio de crecimiento celular D-MEM	59
3.3.7. Medio de crecimiento viral D-MEM	59
3.3.8. Solución de trabajo Tripsina –TPCK.....	60
3.4. Titulación viral por Hemaglutinación	60
3.4.1 Interpretación de la titulación viral por Hemaglutinación	61
3.4.2. Comprobación del título viral previo a la prueba de IH.....	61
3.4.3. Hemadsorción de los sueros problema.....	62
3.4.4. Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA)	62
3.4.5. Interpretación de los resultados de IHA	63
3.5. Cultivo Celular	63
3.5.1. Preparación de células MDCK.....	64
3.5.2. Inoculación de las células.....	64
3.5.3. Cosecha del virus	64
CAPÍTULO IV.....	65
4. Resultados	65
4.1 Características sociodemográficas	65
4.2 Sintomatología compatible con infección con el virus de influenza en la última semana	67
4.3 Vacunación contra el virus de influenza	68
4.4 Diagnóstico previo de infección por el virus de influenza.....	69
4.5 Seroprevalencia y reactividad cruzada	71
4.6 Participantes vacunados y no vacunados contra el virus de influenza	72
4.7 Determinación de factores asociados contra H1N1 pdm, B Victoria y B Yamagata	73
CAPÍTULO V.....	77
5.DISCUSIÓN	77
CAPITULO VI.....	79

6.Conclusiones.....	79
CAPITULO VII.....	80
VII. BIBLIOGRAFIA	80

VIII. INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Características generales del genoma y proteínas virales de influenza A

Tabla 2. Operacionalización de variables

Tabla 3. Distribución por estado natal

Tabla 4. Distribución porcentual de seroprevalencia entre participantes vacunados y no vacunados.

Tabla 5. Análisis bivariado de la seroprevalencia del subtipo A H1N1 pdm según variables demográficas y factores de riesgo.

Tabla 6. Análisis bivariado de la seroprevalencia del subtipo B Victoria según variables demográficas y factores de riesgo.

Tabla 7. Análisis bivariado de la seroprevalencia del subtipo B Yamagata según variables demográficas y factores de riesgo.

VII. INDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Microscopia electrónica del virus de influenza A.

Figura 2: Estructura del virus de influenza

Figura 3: Representación esquemática de la estructura genómica de los virus orthomyxoviruses.

VIII. INDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Proporción porcentual por género.

Gráfica 2. Proporción porcentual por ocupación.

Gráfica 3. Distribución de los pacientes pediátricos por género.

Gráfica 4. Proporción de sintomatología compatible con la infección de influenza.

Gráfica 5. Distribución porcentual de participantes vacunados y no vacunados.

Gráfica 6. Distribución porcentual de participantes con diagnóstico previo de influenza por subtipo.

Gráfica 7. Proporción de seroprevalencia por subtipo viral.

CAPÍTULO I

1.1. Introducción

La infección respiratoria aguda causada por el virus de la influenza es un problema de salud pública que causa la muerte de alrededor de 10 a 15 mil personas en el mundo, y cada año causan un estimado entre 200,000-500,000 hospitalizaciones¹⁻⁵. La aparición de variaciones del virus es uno de los principales desafíos que enfrenta la prevención de la infección con el virus de la Influenza. Este virus se clasifica en la familia *Orthomyxoviridae*, compuesta por cuatro géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* y *Thogotovirus*. La gripe humana está causada fundamentalmente por los virus de la gripe A y B⁶, y se han descrito casos esporádicos por el virus de la gripe C⁷. Los virus de la gripe A y B se caracterizan por ser virus de simetría helicoidal con envoltura y genoma de ARN monocatenario segmentado⁸. Ambos virus contienen ocho segmentos de ARN, cada uno de ellos con su correspondiente cápside proteica, y poseen, en la envoltura, dos glucoproteínas que dan lugar a proyecciones de dos tipos: hemaglutinina(HA) y neuraminidasa(NA)⁹. La HA, una vez activada enzimáticamente por proteasas del tracto respiratorio, es la responsable de la unión del virus a sus receptores celulares de ácido siálico y de la fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática de la célula diana, procesos que determinarán la penetración de la nucleocápside en el interior celular¹⁰.

La HA induce la producción de anticuerpos que neutralizan la infectividad viral, al impedir su unión a los receptores celulares¹¹, que es de gran importancia en la inmunidad protectora frente a la gripe. Si bien los anticuerpos frente a la NA no neutralizan la infectividad del virus, éstos poseen un importante papel en la reducción de la difusión viral en el epitelio respiratorio¹². Los virus de la gripe A y B son antigénicamente diferentes y no presentan inmunidad cruzada¹³. El virus de la gripe A se clasifica en subtipos basándose en los antígenos de la HA y la NA. Se han descrito un total de 16 HA y 9 NA para el virus de la gripe A en su reservorio natural aviar¹⁴. Únicamente tres HA (H1, H2 y N3) y tres NA (N1, N2 y N8) se han asociado con infección establecida en el hombre, causada por cinco subtipos de

virus gripal A: H3N8, H1N1, H2N2, H3N2 y H1N2¹⁵. Las pandemias y los brotes epidémicos anuales de Influenza se producen como consecuencia de la variación de los antígenos de la HA y posiblemente también de la NA¹⁶. La gripe pandémica es la consecuencia de variaciones mayores o sustituciones antigénicas (*antigenic shift*)¹⁷, que implican la aparición de un nuevo subtipo de virus de la gripe A con una HA y, en ocasiones, una NA diferentes del virus difundido hasta entonces en la población, frente al que ésta carece totalmente de experiencia inmunológica. Las variaciones mayores se producen por un fenómeno de reasortamiento (reagrupamiento genético, *genetic reassortment*) entre cepas humanas y animales¹⁸, facilitado por la existencia de un ácido nucleico segmentado, en aquellas situaciones en que una misma célula sea infectada por dos subtipos diferentes del virus de la Influenza. Los brotes epidémicos anuales son producidos por virus del mismo subtipo que presentan variaciones menores (*antigenic drift*)¹⁹, caracterizadas por la acumulación de cambios de aminoácidos, fundamentalmente en la HA, que dificultarán la unión a los anticuerpos y, en consecuencia, reducirán la inmunidad a la infección por las nuevas variantes antigénicas²⁰. Éstas, que se seleccionarán lentamente a través de numerosos pases en personas inmunizadas, son las responsables de las modificaciones anuales de la vacuna²¹. El virus de la gripe B presenta variaciones menores con menor frecuencia y éstas no se han demostrado para el tipo C. Los virus de la gripe A y B circulan conjuntamente entre la población, y en una temporada de gripe determinada puede predominar cualquiera de ellos.

Así, la principal característica de los virus de la Influenza es su variabilidad antigénica²⁰, que les permitirá evadir la respuesta inmunitaria y ser causa de brotes epidémicos anuales y, con menor frecuencia, de pandemias de gripe. A pesar de la gravedad de las pandemias, la incidencia acumulada es superior como consecuencia de las epidemias anuales durante los períodos interpandémicos²³. El grado de variación en las propiedades antigénicas de los virus actualmente en circulación se halla reflejado en el número de cambios recomendados en la composición de la vacuna²⁴. La mayor variabilidad antigénica de los virus H3N2 ha requerido 20 cambios en el componente de la vacuna desde 1972. Por el contrario,

los 11 cambios del componente del virus de la gripe B y los siete del componente H1N1 realizados durante el mismo período demuestran la menor variabilidad antigénica de estos virus²⁵. Se ha demostrado que el reagrupamiento genético ocurre de forma espontánea en la naturaleza^{26,27}. Si bien el origen del subtipo H1N1, que circuló entre 1918 y 1957, es todavía incierto^{28,29}, los subtipos causantes de las pandemias de gripe asiática (1957) y gripe Hong Kong (1968) fueron el resultado de reagrupaciones genéticas entre los genomas de los virus previamente circulantes y virus aviares³⁰. Así, el subtipo H2N2 (1957) mantuvo cinco segmentos del subtipo H1N1 precedente, que a su vez adquirió tres segmentos (HA, NA y PB1) procedentes de un virus aviar. Posteriormente, la adquisición de la HA aviar H3 y del segmento PB1 por el virus H2N2, dio lugar a una nueva cepa pandémica H3N2 (1968)^{30,31}. La pandemia del 2009 del virus de la influenza subtipo A (H1N1) que contenía una recombinación interespecífica de sus genes (porcino, aviar y humano), ya que el origen de los genes que codifican para las proteínas H1, NP, M, NS y NA fue porcino, el origen de los genes PB2, PA y PB1 fue humano. Los genes NA y M fueron homólogos a cerdos que fueron infectados con el virus de la influenza A, procedente de Eurasia en 1990, y los genes PB1, PB2, PA, NP y NS tuvieron un 99 a 100 % de homología con cepas de virus de influenza A H1N1 procedentes de Estados Unidos en 1990^{32,33}.

La principal estrategia en la prevención de la influenza, es la vacunación sistemática y repetida de la población susceptible. Las variaciones antigénicas que experimenta el virus que la causa, obliga a modificar anualmente la composición de las cepas que integran la vacuna³⁴. En respuesta al rápido cambio antigénico del virus de la Influenza, el uso extensivo de vacunas virales inactivadas es considerado como el método más eficaz³⁵. Sin embargo, la producción de vacunas no puede ser adecuada para satisfacer el aumento de la demanda cuando se produzca una pandemia de influenza. La severidad de la influenza en los humanos se relaciona con cepas de nueva circulación frente a estados inmunológicos incapaces de neutralizar al virus³⁶. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevos métodos de seroprevalencia del virus influenza para identificar las cepas circulantes en determinada región.

CAPÍTULO II

2.1 Antecedentes

2.1.1. Historia de la gripe humana

La gripe es una enfermedad infecciosa que afecta las vías respiratorias y produce padecimientos agudos, es altamente contagiosa entre la población y parece haber afectado al ser humano desde tiempos antiguos. El antecedente histórico que se tiene conocimiento de esta enfermedad, fue realizada por Hipócrates en el año 412 A.C. El término “Influenza” proviene del latín “Influentia”, y se utilizó en el siglo XV para designar epidemias atribuidas a la influencia de estrellas, planetas o poderes ocultos; los autores ingleses acuñaron el término “Influenza” en el siglo XVII. En Francia, por la misma época, prefirieron el nombre de “grippe”, del que deriva el nombre en español, en clara referencia al componente catarral de la enfermedad. Posteriormente ha habido numerosos episodios de gripe en la edad media, y por supuesto en la época moderna. Entre los años 1918 a 1919 surgió la peor pandemia de influenza en la historia, en donde se reportaron aproximadamente 50 millones de defunciones. Esta enfermedad se difundió por América del Norte, Europa y las islas del Pacífico. La mayoría de las muertes acontecieron en los adultos jóvenes de 15 a 34 años³⁷. En los estudios de epidemiología molecular se analizaron nueve fragmentos (HA, NA, N, M1 y M2) de RNA extraído de tejido pulmonar de las víctimas de la pandemia de 1918. Realizaron un análisis filogenético, con dos programas: El programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y el PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony), con el algoritmo del vecino más cercano (N-J) y una matriz de distancia de verosimilitud con el modelo Jukes cantor.

Esta hipótesis filogenética determinó que las secuencias de aminoácidos de estos nueve fragmentos son compatibles con una nueva cepa de influenza A H1N1 que pertenece al subtipo de virus que infecta a cerdos, humanos y no corresponde al subtipo aviar. Así mismo estudiaron los genes no estructurales NS1 y NEP³⁸, mediante estudios filogenéticos y determinaron que estos genes

eran más idénticos y cercanos a cepas de humanos y cerdos. Existe la hipótesis que el virus de 1918 es el antecesor de los subtipos humanos y porcinos H1N1 y H3N2, así como del subtipo extinto H2N2³⁹. Sin embargo determinaron que los antígenos del virus de la influenza de 1918 estaba más relacionado con cepas de influenza aviar que de mamíferos y que probablemente esta pandemia se había originado de las aves⁴⁰.

Estudios filogenéticos realizados al virus de la influenza del tipo A han demostrado que existe una prevalencia de transmisión interespecífica⁴¹. La influenza porcina se detectó por primera vez en 1930 en los Estados Unidos, Hungría y China^{41,42}. Investigaciones serológicas y genéticas del antígeno HA confirmaron que humanos y cerdos fueron infectados por el virus de la influenza del subtipo H1N1, que derivaba de un ancestro común, y que posiblemente la transmisión del virus fue de humanos a cerdos. La transmisión del virus de la influenza aviar, entre cerdos y humanos, se evidenció hasta el año de 1976 cuando el virus H1N1 fue aislado de soldados que habían muerto en Fort Dix, USA, este virus fue idéntico a nivel genético y antigénico al virus H1N1, que se aisló de cerdos en los USA⁴¹. Entre 1983 a 1985 cepas de la influenza porcina fueron aisladas en Italia, las hipótesis filogenéticas evidenciaron que hubo una recombinación entre los genes que codifican para proteínas de superficie de los subtipos humano-porcino H3N2 y H1N1 de cerdos pero de origen aviar⁴³.

Entre 1992 a 1995 al Norte de Italia, evaluaron la frecuencia de transmisión de los subtipos H1N1 y H3N2 porcino al humano. Inocularon un total de 84 cepas de la influenza, en huevos embrionados de pollo. Evaluaron 123 sueros humanos que fueron caracterizados antigénicamente por el método de inhibición de la hemaglutinación (IH) y antisueros policlonales, para las cepas H1N1 y H3N2 de aves y mamíferos. Ellos concluyeron que los virus de la influenza porcina se habían transmitido a personas menores de 20 años que habían tenido contacto con cerdos. Diversas publicaciones científicas^{43,44,45} citan que el cerdo es el reservorio de los virus de influenza humanos y aviares, debido a que posee los

dos receptores celulares aviar y humano del tipo Ácido siálico 2,3 y Gal 2, 6. Estos estudios han evidenciado que en el cerdo es en donde se generan nuevas variantes recombinantes del virus de la influenza que se transmiten a otras especies de organismos con potencial pandémico, en la población humana^{44,46}.

En noviembre del 2008 una mujer de 50 años, procedente de un pueblo de Aragón España, presento síntomas como irritación nasal, fiebre, tos, dolor de cabeza, escalofríos y cansancio extremo. Para determinar el origen de estos síntomas se realizó una inoculación de secreciones respiratorias en un cultivo celular con células (MDCK), este cultivo dio positivo al tipo de influenza A. Posteriormente la caracterización y análisis filogenético de los genes HA, NA, M y NS determinaron que el subtipo de este virus, correspondía al H1N1 de origen porcino. Además las investigaciones epidemiológicas establecieron, que esta persona, trabajaba en una granja porcina y tenía contacto directo con los cerdos⁴⁷. En marzo del 2009, en San Diego California un niño de diez años presento síntomas del virus de la influenza (fiebre, tos y vómitos), En marzo del 2009 una niña de nueve años originaria del condado Imperial, California, presento los mismos síntomas epidemiológicos del niño de diez años de San Diego, y al analizarse las muestras nasofaríngeas ambos casos fueron diagnosticados con el virus de la influenza subtipo A (H1N1) que contenía una recombinación interespecífica de sus genes (Porcino, aviar y humano). El origen de los genes que codifican para las proteínas H1, NP, M, NS y NA fue porcino, el origen de los genes PB2, PA y PB1 fue humano. Los genes NA y M fueron homólogos a cerdos que fueron infectados con el virus de la influenza A, procedente de Eurasia en 1990, y los genes PB1, PB2, PA, NP y NS tuvieron un 99 a 100 % de homología con cepas de virus de influenza A H1N1 procedentes de Estados Unidos en 1990^{48,49}.

En los meses de abril a mayo del año 2009, se confirmaron 642 personas infectados con el virus de la influenza en 41 estados de los Estados Unidos. El 60% de las personas infectadas oscilaba entre los 18 años o menores. De las 642

personas infectadas el 18% viajó a México, de los cuales el 16% fueron estudiantes que vacacionaron en este país. Se identificó la misma cepa viral subtipo A H1N1 humana de origen (porcino, aviar y humano) en los pacientes mexicanos. Los síntomas más comunes que presentaron estas personas fueron: Fiebre (94% de los pacientes), tos (92%), dolor de garganta (66%), diarrea y vómito (25%). De un total de 399 pacientes 36 (9%) requirió hospitalización, 12 presentaron neumonía, 8 estuvieron en cuidados intensivos y dos murieron⁴⁸. En el reporte se informó que la influenza A H1N1 humana se identificó en México de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, y que el 25 de mayo del 2009 el virus se expandió a 43 países con 12, 515 casos de los cuales 91 personas murieron. El subtipo H1N2 desciende del subtipo recombinado porcino H3N2 originario de Norte América que se expandió a nivel mundial. En el GenBank se encuentran 220 secuencias de cepas del virus de la influenza A H1N1 humano del 2009, originarias de diversos países. La alineación de estas secuencias arrojó un 99% de identidad en todas las secuencias, el 95% de estas secuencias se aislaron dos años anteriores a su aparición en el 2009, estos datos demuestran un gran porcentaje de similitud entre las cepas de influenza humana A H1N1. El origen de la mayoría de cepas de influenza son principalmente de Norte América, y Europa, seguido por Oceanía y Asia, no se han detectado casos en África y Sur América. La influenza porcina A (H1N1) de Norte América y Europa muestran un gran porcentaje de similitud, sin embargo la influenza porcina de Asia contiene cepas mixtas de Norte América y Europa⁴⁹.

Se compararon las secuencias de aminoácidos del virus de la influenza A H1N1/2009 recolectados del primero de abril al 31 de diciembre del 2009, con virus de la influenza aislados del humano, cerdos y aves. Se realizó un análisis de secuencias con los virus de la influenza que causaron pandemias en 1918 H1N1, 1957 H2N2, 1968 H3N2 y 1977 H1N1. Se identificó la mutación de valina por isoleucina en la posición 100 del gen NP. En la pre-fase de alerta solo el 10% de las cepas de H1N1 2009 mostraron este cambio, mientras que en las fases temprana, mediana y tardía se mostró un cambio del 57%, 80% y 93%

respectivamente. Además se detectaron mutaciones en los genes NA-91, NA-233, HA-206 y NS1-123, las mutaciones de los estos genes se encuentran localizados en dominios funcionales, excepto la mutación del gen de la NA-91, esto demostró que la función de estas mutaciones otorgo la adaptación y virulencia de H1N1 2009 en el humano. Los resultados arrojaron un porcentaje de similitud del virus de la influenza tipo A H1N1/2009 del 55%, 15%, 13% y 19% a los virus de 1918, 1957, 1968 y 1977 respectivamente. Y la comparación del H1N1/2009 con virus de la influenza del humano, cerdo y aves fue del 17%, 94% y 75% respectivamente. Este resultado confirmó que el H1N1 2009 se origina del virus de influenza de cerdos y esta cepa es muy cercana al virus de la influenza que origino la pandemia de 1918 H1N1.

A partir de la pandemia H1/N1/2009, entre los años de 1990 a 2009, en Italia se han establecido programas de vigilancia de la influenza en las granjas porcinas. En mayo del 2010 se detectaron síntomas de la influenza en aproximadamente el 10% de los cerdos de las granjas porcinas de este país. Para realizar el diagnóstico del virus de la influenza tipo A H1N1/2009, se realizó un homogenizado de pulmón en los cerdos que mostraban síntomas de esta enfermedad, se llevó a cabo un RT-PCR en tiempo real, el virus se cultivó en huevos embrionados de pollo SPF (CEE) y células Caco-2. Al tener la secuencia completa del genoma se realizó un análisis filogenético. El resultado mostró que todos los genes del virus, excepto el gen de NA, pertenecen a la influenza A H1N1/2009 cuya nomenclatura es A/Sw/116114/2010, el gen de NA fue muy homologo al subtipo H1N2 doble recombinación que en años anteriores fue aislado de cerdos originarios de Italia y Suecia⁵⁰.

Otros estudios reportaron que en África del Sur en 2009 y 2010, se identificó el virus de la influenza A H1N1/2009, y antigénicamente fue muy similar a cepas virales de otros países del hemisferio Norte y Sur. Mediante este tipo de investigaciones se puede evitar pérdidas económicas importantes en los hospitales del sector salud, además se evita que este virus cruce las barreras

interespecíficas y cause infecciones humanas. 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 estudios epidemiológicos de seroprevalencia puede ayudar a mitigar esta problemática, tras rastreos anuales y evaluando la dinámica evolutiva de los virus.

2.1.2. Clasificación de la influenza y nomenclatura

El virus de la gripe pertenece a la familia Orthomyxoviridae que incluye los géneros Influenza A, B y C. Esta familia se caracteriza por tener envuelta lipídica y un genoma segmentado de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. Los virus de esa familia se dividen en varios géneros: *Influenzavirus A*, que infecta a humanos, algunos mamíferos y gran variedad de aves; *Influenzavirus B*, que infecta únicamente a humanos; *Influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus*, que incluye los virus Thogoto y Dhori; y el género *Isavirus*, cuyo componente más importante es el virus de la anemia del salmón. Desde el punto de vista epidemiológico, los virus del tipo A son los principales causantes de las epidemias anuales de gripe, mientras que los del tipo B suelen dar lugar a brotes epidémicos más localizados.



Figura 1: Microscopía electrónica del virus de influenza A. Tomada de: <http://oltokozpont.hu/index.php?id=352>

El virus de la gripe C, aunque está poco estudiado, parece tener un comportamiento endémico, produciendo casos esporádicos de enfermedad leve. El virus de la gripe A infecta, además de al hombre, a múltiples mamíferos terrestres (cerdos, caballos) y marinos (focas y ballenas), aves domésticas (pollos, patos y pavos) y salvajes (patos, ánsares y gaviotas), siendo en estos últimos donde se encuentra su principal reservorio⁵¹. El virus de la gripe B infecta sólo a humanos, aunque recientemente se ha aislado de otros mamíferos (focas)⁵²; el virus de la gripe C afecta a humanos y cerdos. Los géneros A, B y C se distinguen entre sí por las diferencias antigénicas presentes en las moléculas de nucleoproteína (NP) y en la proteína mayoritaria de la matriz, M1. Además, los influenzavirus tipo A se dividen en subtipos basándose en la naturaleza antigénica de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Estos subtipos difieren en el rango de hospedador y la patogenicidad^{53,54}. En cuanto a su nomenclatura, incluye el hospedador de origen, la localización geográfica del aislado, el número de cepa y el año de aislamiento. La descripción antigénica de la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) viene dado entre paréntesis, pe: A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1). Por convención, cuando el hospedador de origen es el ser humano no se incluye, pe: A/Victoria/3/75 (H3N2).

2.1.3. La partícula viral

La partícula viral tiene un tamaño de 80 a 120 nm de diámetro, son pleomórficos de simetría helicoidal, existen formas esféricas y filamentos largos. La morfología viral es un rasgo genético y varias proteínas virales (HA, NA, M1 y M2) forman parte de la morfología del virus de la influenza^{55,56}. El virus de la influenza está constituido por 3 capas: La capa externa se encuentra formada por una bicapa lipídica, integrada principalmente por colesterol y esfingolípidos, se deriva de la membrana celular del huésped. En esta envoltura se insertan las glicoproteínas HA, NA y la proteína matriz 2 (M2)^{57,58}. La HA es la proteína principal de la envoltura del virión (80%), la escisión de esta proteína en HA1 y HA2 es importante para la infectividad viral. La NA es la segunda proteína más

abundante (17%) y la M2 es un componente menor (16 a 20 moléculas/virión)⁵⁸. Hacia el interior de la partícula viral se localiza la proteína matriz 1 (M1), que envuelve a la nucleocapside, que consiste en (genoma viral) vRNA y la nucleoproteína (NP), cantidades menores de proteína exportadora nuclear (NEP), tres polimerasas (PB2, PB1 y PA), además existen dos proteínas virales no estructurales (NS1 y NS2) (Figura 2)⁵⁹. Bajo esta envuelta se encuentra el armazón proteico del virus formado principalmente por la proteína M1 y en menor medida y asociada a ésta, por la proteína NEP (antes denominada NS2)^{60,61}. M1 es la proteína más abundante del virión e interacciona tanto con los tallos citoplasmáticos de las proteínas de la envuelta, como con las RNPs situadas en el interior^{62,63}. Por el contrario la proteína NEP (*Nuclear Export Protein*) es la proteína estructural menos abundante y se ha descrito su implicación en la exportación de las RNPs al citoplasma⁶⁴.

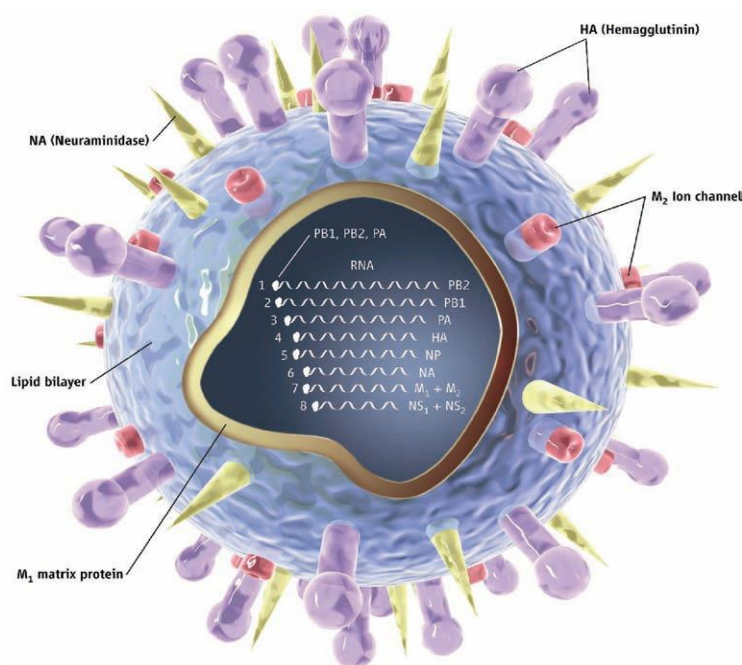


Figura 2: Estructura del virus de la influenza. Hemagglutinina (HA), Neuraminidasa (NA), proteína de la matriz (M1), proteína transmembranal (M2), proteínas no estructurales (NS1 y NS2), nucleoproteína (NP), polimerasa A (PA), polimerasa B1 (PB1), polimerasa B2 (PB2). Esta figura fue tomada del manual para el diagnóstico y supervisión del virus de la influenza en el laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En el interior de la partícula viral se localiza el genoma segmentado del virus. El RNA viral se encuentra asociado a la proteína NP y unido por sus extremos al complejo de la polimerasa, formado por las proteínas PB1, PB2 y PA, formando unas estructuras denominadas ribonucleoproteínas (RNPs). Hay un total de 8 de estas estructuras, que son las encargadas de llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción. Además el virus expresa cuatro proteínas no estructurales, NS1, PB1-F2, N40 y PA-X. NS1 se sintetiza a partir de transcrito primario del segmento 8 y se le atribuyen numerosas funciones regulatorias en distintas etapas de la infección y como factor clave en el bloqueo de la respuesta interferón (IFN).

En el apartado 5.2 se explicará con más detalle las funciones de esta proteína. La proteína PB1-F2 se ha descrito hace poco y se conocen muy pocas cosas de ella. Se localiza preferentemente en las mitocondrias y se ha relacionado con procesos de apoptosis⁶⁵ y con la regulación de la respuesta inmune celular. N40 se ha descubierto muy recientemente, y lo único que se conoce es que parece no ser esencial para el virus⁶⁶. Hace pocos meses se ha publicado la caracterización de tres nuevas proteínas derivadas del segmento 3 del virus, PA-X, PA-152 y PA-182. PA-X modula la respuesta de la célula hospedadora y se la ha relacionado con la virulencia del virus. Por el momento se desconoce la función de PA-152 y PA-182, aunque se ha observado que en virus que no expresan ambas proteínas, la patogenicidad y la replicación disminuye significativamente⁶⁷.

2.1.4. Características de las proteínas virales

En la envuelta del virión se encuentran las glicoproteínas de membrana HA y NA. Las funciones más importantes de HA son el reconocimiento del receptor celular del virus, el ácido siálico, y la fusión con la membrana celular⁶⁸. La proteína NA es un homotetrámero con forma de bastón^{69,70} y su función es eliminar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular, permitiendo la liberación de los nuevos viriones al espacio extracelular. Dentro de los virus tipo A se han descrito 16 subtipos de HA y 9 de NA. La combinación de los distintos

subtipos de HA y NA determina la variabilidad viral, y afecta al rango de hospedador y la patogenicidad de las distintas cepas⁷¹. En la envuelta del virión también se encuentra anclada la proteína M2 (Figura 2)⁷² cuya estructura biológicamente activa es un tetrámero que forma un canal iónico^{73,74,75}. Su función principal es permitir el paso de protones de los endosomas al virus. La proteína M2 también está implicada en la alteración de la proporción de partículas filamentosas y esféricas (Roberts et al, 1998) y en el ensamblaje y liberación de viriones⁷⁶. La proteína M1 es la más abundante del virión (Figura 2) y la más conservada evolutivamente. Forma una malla estructural por debajo de la envuelta lipídica que conecta los componentes del interior del virus con las proteínas de la envuelta⁷⁷. Una de sus superficies es altamente hidrofóbica, lo que permite que interactúe con membranas, mientras que la superficie opuesta está cargada positivamente y probablemente interactúe con el RNA.

La proteína M1 interactúa con las RNPs y con la proteína NEP. Se ha propuesto que M1 tiene un papel clave en el ensamblaje de los viriones reclutando los componentes virales al lugar de ensamblaje en la membrana plasmática. La proteína NEP (antiguamente denominada NS2) es poco abundante en el virión, interactúa con el receptor de exportación nuclear CRM1⁷⁸ y con varias nucleoporinas. La proteína NEP también interactúa con M1, sugiriendo que la exportación de las RNPs progenie del núcleo se realice mediante el complejo RNP-M1-NEP. En el interior de la matriz estructural se encuentra el genoma segmentado del virus, compuesto por ocho ribonucleoproteínas (RNPs) (Figura 2), que contienen un total de aproximadamente 13500 nucleótidos. Estas ocho moléculas de RNA genómico codifican once proteínas (Figura 2), gracias a mecanismos de procesamiento alternativo (*splicing*) de los segmentos 7, 8 y a la utilización de una fase de lectura abierta (ORF) alternativa del mRNA del segmento 2 (Figura 2). Las RNPs están compuestas por un segmento de RNA genómico superenrollado tapizado en toda su longitud por la nucleoproteína (NP)⁷⁹ y un complejo de polimerasa viral, que tiene tres subunidades: PB1, PB2 y PA. Estas RNPs forman las unidades básicas funcionales que llevan a cabo los

procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada. Las RNPs y sus componentes se describen en mayor detalle más adelante.

Las proteínas NS1 y PB1-F2 se expresan durante la infección viral pero por el momento no se han detectado en el virión. La proteína NS1 está implicada en diferentes funciones: a) Modulación del proceso de *splicing*: Los segmentos 7 y 8 del virus de la gripe producen 2 proteínas cada uno, por lo que requieren un procesamiento post-transcripcional para su correcta expresión. Además NS1 inhibe el *splicing* de los mRNAs celulares, y el de su propio mRNA⁸⁰; b) Inhibición del procesamiento 3' del pre-mRNAs: NS1 impide la maduración de los mRNAs celulares inhibiendo el corte y poliadenilación del extremo 3'. El procesamiento de los mRNAs virales no se ve afectado porque el mecanismo es distinto; c) Inhibición del transporte de mRNAs: NS1 promueve la retención nuclear de mRNAs celulares poliadenilados que se transcriben bajo el control de la RNA polimerasa II; d) Modulación de la actividad de la polimerasa viral: NS1 interacciona con el RNA viral y con la polimerasa viral y/o las RNPs; e) Estimulación de la traducibilidad de los mRNAs virales: Durante la infección viral se favorece la traducción de proteínas virales. Se han descrito diferentes mecanismos para explicar este proceso: como la unión de NS1 al extremo 5'UTR del mRNA viral, y su interacción con el factor de traducción eif4G; f) Morfogénesis viral⁸¹; g) Inhibición de la maquinaria de defensa celular. NS1 impide la activación de la PKR a través de su unión a RNAs de doble cadena o dsRNA⁸² y la interacción directa entre NS1 y PKR. NS1 inhibe el sistema de silenciamiento celular mediado por RNA interferente⁸³, previene la activación del sistema 2'-5' OAS/RNAsaL⁸⁴, y la transcripción de los factores IRF3, IRF7, NFκB y Jun/ATF2 mediante la unión a RIG-I. NS1 es fundamental para la inhibición de la respuesta mediada por interferón que se desencadena en la célula huésped tras ser infectada con el virus. La proteína PB1-F2 se localiza en la membrana de las mitocondrias y se ha demostrado que induce apoptosis. Esta proteína es un factor importante de patogenicidad ya que favorece la aparición de enfermedades bacterianas secundarias y además regula la actividad de la polimerasa mediante la interacción con la subunidad PB1⁸⁵.

2.1.5. El genoma viral

El genoma del virus de influenza A consiste en 8 segmentos ARN de cadena simple que codifican para 11 proteínas. La HA (codificada por el segmento genómico 4) y la NA (codificada por el segmento genómico 6) son las proteínas más abundantes del virus y están localizadas en su envoltura. De acuerdo a las características antigénicas de estas glicoproteínas, el virus es clasificado como se dijo anteriormente en subtipos. Los segmentos 1 a 3 codifican para el complejo viral de polimerasas (polimerasa básica 1, PB1, polimerasa básica 2, PB2 y polimerasa acida, PA). El segmento 2 contiene un segundo marco de lectura en +1, que codifica la proteína PB1-F2. Los segmentos 4 y 6 codifican la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) respectivamente. El segmento 5 codifica la Nucleoproteína (NP), el segmento 7 las proteínas Matriz 1 y Matriz 2 y el segmento 8 las proteínas NS1 y NEP/NS2. Las proteínas M2 y NEP/NS2 están codificadas por ARNm splicing (Figura 3).

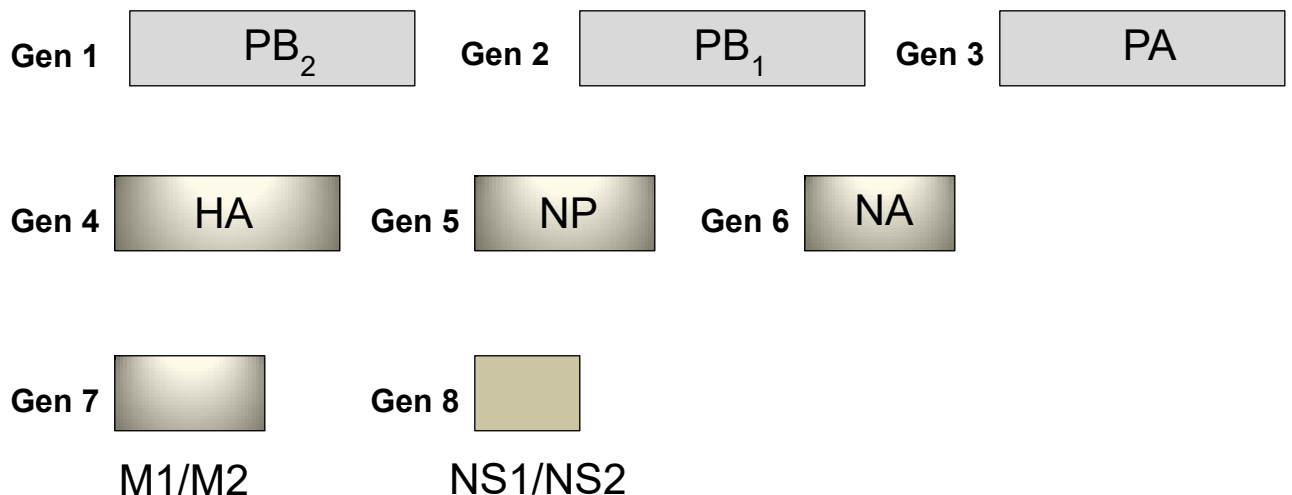


Figura 3.- Representación esquemática de la estructura genómica de los virus Orthomyxoviruses.

Los segmentos de ARN del virus son capaces de codificar distintos tipos de proteínas encargadas de realizar diferentes funciones. Dentro de estas, se distinguen dos tipos de proteínas: i) Proteínas estructurales, que como su nombre

indica están presentes en la partícula viral completa. Son proteínas virales: la hemaglutinina HA, la neuraminidasa NA, la matriz M1, la proteína transmembrana M2 para formación de canales iónicos, nucleoproteína NP y un complejo formado por las proteínas PA, PB1 y PB2, denominado complejo polimerasa; y las proteínas: ii) No estructurales, que están presentes solamente en la célula infectada. Pueden aparecer en el núcleo como NS1, o en el núcleo y citoplasma como NS2. Su función es específica sobre el ARN celular, al que modifican funcionalmente para que dirija su proceso a la síntesis de proteínas virales.

Tabla I. Características generales del genoma y proteínas virales de influenza A

Segmento	Proteína	Longitud (nt)	Tamaño(aa)	Abundancia	Función identificada
1	PB2	2320	759	30-40	RpdR: unión del cap y favorece a la Transcriptasa.
2	PB1	2341	757	30-40	RpdR: actividad en elongación por la transcriptasa.
3	PA	2211	716	30-40	RpdR: actividad proteolítica por la proteasa.
4	HA	1757	566	500	Hemaglutinina, reconocimiento del receptor celular.
5	NP	1540	498	1000	Unión al RNA por la nucleoproteína. Parte del complejo de transcripción, transporte nuclear/citoplasmático de ARN viral.
6	NA	1392	454	100	Neuraminidasa, liberación de las nuevas partículas virales.
7	M1	1027	252	3000	Proteína matriz: componente principal del

					virión.
	M2	315	96	50	Proteína integral de membrana para canal iónico.
8	NS1	868	230		Proteína no estructural. Sólo en núcleo de células infectadas. Efecto sobre transporte, división, traducción (proceso de splicing) de ARN celular y efecto anti-interferón.
	NS2	395	121	50	Proteína no estructural. Facilita el transporte del RNP desde el núcleo hacia el citoplasma celular.

En la **Tabla I** se puede observar las proteínas virales, la longitud de nucleótidos (nt), el tamaño de aminoácidos (aa) y la abundancia de partículas virales.

2.1.6. El ciclo de infección del virus influenza

2.1.6.1. Entrada de las partículas virales

El virus de la gripe infecta células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados. El virus de la gripe, al igual que el resto de virus es un parásito intracelular obligado, por lo que necesita desarrollarse dentro de la célula a la que infecta. Allí, gracias a distintas estrategias consigue manipular muchos de los procesos celulares en su propio beneficio y desarrollar de esa forma su ciclo vital. La replicación de los *Orthomyxovirus* tiene una duración aproximada de seis horas y mata habitualmente a la célula hospedadora, también está muy bien regulado tanto a nivel temporal como espacial. Así, se pueden distinguir una serie de etapas como: la entrada del virus; la expresión génica, que incluye los procesos de transcripción viral así como la maduración de los transcritos y su traducción; la replicación del RNA viral y por último la formación y liberación de las nuevas partículas virales. A diferencia de otros virus ARN, la síntesis viral ocurre dentro del núcleo.

La adhesión es un proceso físico-químico esencial, no enzimático. El virus se une a las células permisivas vía la hemaglutinina, la cual se une a glicolípidos de la membrana celular o a glicoproteínas que contienen ácido siálico, el receptor para la adsorción del virus. La afinidad de la HA por los residuos de ácido siálico depende de la naturaleza de su enlace al sacárido en la glicoproteína, así, dependiendo de si este enlace es α -2-3 o α -2-6, las HA de distintos virus Influenza han evolucionado para adaptar su sitio de unión. De este modo, la interacción con el receptor se constituye en un primer factor de especificidad de especie. En las aves, los virus replican usando residuos de ácido siálico unidos por enlaces a (2,3), mientras que en mamíferos usan enlaces a (2,6)⁸⁶. Aunque la interacción de la HA con el ácido siálico es de baja afinidad, se logra una alta afinidad del virus por la superficie celular debido a múltiples interacciones de baja afinidad. De esta forma la glicoproteína HA de la superficie viral se une al receptor por medio del ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos⁸⁷ **(Figura I7-1)**.

Tras la adsorción, la entrada del virus se produce por endocitosis mediada por receptor en vesículas de clatrina^{88,89}. Una vez formada la vesícula, ésta se fusiona con lisosomas y se produce una acidificación en el interior que da lugar a la formación de endolisosomas. El pH interno de los virus disminuye progresivamente gracias al canal iónico que forma la proteína M2⁹⁰. Este canal permite el paso de los protones desde los endolisosomas al interior de la partícula, lo que promueve la desestabilización de la interacción entre las RNPs y M1. Además, el pH ácido provoca un cambio conformacional de la proteína HA que induce la fusión de las membranas del virus y de la vesícula endocítica, y la liberación de las RNPs⁹¹ **(Figura I7-2)**. Una vez en el citoplasma, las RNPs libres de M1 son transportadas al núcleo, gracias a la interacción de NP con la importina α ⁹² **(Figura I7-3)**, donde tendrán lugar los procesos de transcripción y replicación.

2.1.6.2. Iniciación y elongación de los mRNAs virales

Los complejos de RNP no permanecen en el citoplasma sino que migran hacia el núcleo, ya que la ARN polimerasa del virus de la influenza no puede

iniciar la transcripción de los segmentos del genoma de ARN de cadena negativa en ARN mensajeros sin un cebador; usando para este fin la región 5' terminal de los ARN mensajeros celulares que son sintetizados en el núcleo. Una vez que las RNPs han atravesado la membrana nuclear y se encuentran en el núcleo comenzarán los procesos de transcripción y replicación del RNA viral. Ambos son llevados a cabo por la polimerasa viral, siempre en el contexto de la RNP⁹³. La síntesis de los mRNAs virales requiere que la maquinaria de transcripción celular dirigida por la RNA polimerasa II (RNA PolII) esté funcionando de manera activa⁹⁴. Para llevar a cabo la iniciación de la síntesis de mRNAs virales, la polimerasa emplea cebadores que obtiene de los mRNAs celulares mediante un proceso llamado “robo de *cap*” o *cap snatching*^{95,96}.

Este proceso consiste en la unión de la polimerasa, por medio de PB2, al *cap* de los mRNAs celulares producidos por la RNAP II, seguido del corte endonucleolítico de estos RNAs mediado por PA. La transcripción del ARN mensajero no prosigue hasta el final de las cadenas negativas de ARN sino que se detiene unos 20 nucleótidos antes de la terminación debido a que allí hay señales de poliadenilación en todos los segmentos del genoma. Por lo tanto los ARN mensajeros del virus de la influenza poseen secuencias heterogéneas de 10 a 13 nucleótidos de longitud en el extremo 5' robadas de los ARN mensajeros de la célula huésped. Esto se debe a que la polimerasa viral utiliza estructuras *cap* tipo I de los pre-mRNAs celulares que están siendo sintetizados activamente, como cebadores para la síntesis de sus propios mensajeros^{97,98}. La transcripción viral, por tanto, requiere una transcripción celular activa, y compuestos que inhiben la RNAP II como la α -amanitina o la actinomicina D inhiben también la transcripción viral⁹⁹. A continuación, estos cebadores son elongados por la polimerasa viral mediante la actividad RNA polimerasa RNA dependiente residente en PB1¹⁰⁰ **(Figura I7-4)**.

2.1.6.3. *Splicing* de mRNAs virales

Dos de los transcritos virales, los generados por los segmentos 7 y 8, son sustratos de *splicing* y dan lugar a la expresión alternativa de dos proteínas (M1 y M2, y NS1 y NEP respectivamente)¹⁰¹. La eliminación de los intrones de los transcritos virales es llevada a cabo por la maquinaria celular^{102,103}, sin embargo la polimerasa viral también está implicada regulando por ejemplo la selección del sitio 5' de *splicing* alternativo del mRNA del segmento M. En ausencia de la polimerasa se genera el mRNA M3 pero en presencia de polimerasa, ésta se une al sitio 5' de *splicing* de M3 y lo enmascara. De este modo la maquinaria celular de *splicing* reconoce un sitio alternativo y se genera un mRNA de M2¹⁰⁴.

2.1.6.4. Poliadenilación de los mRNAs virales

La elongación de los mRNAs continúa hasta que la polimerasa alcanza la señal de poliadenilación presente en el vRNA, que consiste en una secuencia de 5 a 7 residuos de uridina situada a unos 15 nucleótidos del extremo 5' del vRNA. La polimerasa copia reiteradamente esta secuencia generándose una cola de poli-A^{105,106}. Se ha propuesto que el extremo 5' del vRNA permanece unido a la polimerasa en todo el proceso de transcripción¹⁰⁷. De este modo, el impedimento estérico generado por la polimerasa al llegar al extremo 5' provocaría la copia reiterada del tramo de uridinas. De acuerdo con esta propuesta, mutaciones en el extremo 5' del vRNA dan lugar a una iniciación de la transcripción eficiente pero los transcritos no son poliadenilados^{106,107}. Como resultado de la transcripción, se generan mRNAs virales indistinguibles de los mRNAs celulares, si bien resultan de procesos de *capping* y poliadenilación completamente distintos. Estudios de trans-complementación genética, en los que se ha rescatado el fenotipo de vRNPs generadas con un mutante de PB2 defectivo en transcripción, han permitido determinar que la síntesis de mRNA viral se realiza en *cis* por la polimerasa residente en la vRNP¹⁰⁸.

2.1.6.5. Traducción de proteínas virales

Los mRNAs virales generados son transportados al citoplasma a través de la membrana nuclear¹⁰⁹ y traducidos por la maquinaria celular (**Figura I7-5**). Los mRNAs virales se traducen más eficazmente que los mRNAs celulares y además, el virus ejerce una regulación negativa sobre estos últimos, reduciendo drásticamente su traducibilidad¹¹⁰. La proteína NS1 tiene un papel clave en este efecto actuando a varios niveles: regula la actividad de la polimerasa viral y el procesamiento de los mRNAs virales y celulares, inhibe el corte y poliadenilación de mRNAs celulares, promueve la retención nuclear y la degradación de mRNAs celulares poliadenilados y estimula la traducción de mRNAs virales^{111,112}. Esta regulación negativa contribuye a un efecto global de inhibición de síntesis de las proteínas de la célula infectada, un proceso conocido como *shut-off* de proteínas celulares.

2.1.6.6. La replicación viral

Las proteínas virales sintetizadas en el citoplasma son transportadas al núcleo y provocan el cambio de la síntesis transcripcional a la síntesis replicativa (**Figura I7-6**). Junto con la síntesis de polimerasa viral, la replicación requiere la síntesis de NP que, además de encapsidar el RNA recién sintetizado¹¹³, se cree que aumenta la procesividad de la polimerasa durante la replicación¹¹⁴ y resulta imprescindible para superar la señal de poliadenilación¹¹⁵. Estudios de trans-complementación genética han permitido determinar que la replicación viral se realiza en *trans* por acción de una polimerasa soluble diferente a la residente en la RNP¹¹⁶. La iniciación de la replicación tiene lugar en ausencia de cebador y el extremo 5' resultante tiene un trifosfato. Además, la elongación del RNA no se detiene en la señal de poliadenilación sino que continúa hasta el final del molde en un evento denominado anti-terminación. La replicación tiene lugar en dos pasos: primero, a partir de las vRNPs paternas (procedentes del virión infectante) se generan las cRNPs que son intermediarios replicativos (**Figura I7-7**), y a partir de

las cRNPs se generan vRNPs progenie que serán encapsidadas en los nuevos viriones. La síntesis de vRNPs está controlada temporalmente y gracias a esta regulación se expresan proteínas tempranas (PB1, PB2, PA, NP y NS1) y proteínas tardías (NEP, M1, M2, HA y NA) durante la infección¹¹⁷.

2.1.6.7. Transcripción secundaria

Las vRNPs generadas tras el proceso de replicación sirven de molde para dar lugar a mRNAs virales durante la transcripción secundaria (**Figura I7-8**). Este proceso es indistinguible mecanísticamente de la transcripción primaria pero el nivel de síntesis de mRNAs es superior ya que la concentración de vRNPs generadas tras los procesos de replicación es muy elevada. En este momento, los procesos de replicación y transcripción secundaria están fuertemente acoplados, mientras que más tarde en la infección se desacoplan para que las vRNPs presentes en el núcleo se dirijan a la formación de nuevos viriones.

2.1.6.8. Ensamblaje de los viriones y liberación

En la fase tardía del ciclo, comienza la formación de nuevas partículas virales (**Figura I7-9**). Las vRNPs que van a formar parte de la progenie viral son transportadas al citoplasma a través del poro nuclear. En este proceso de transporte activo intervienen la proteína M1¹¹⁸, la proteína NEP y la proteína NP de las vRNPs). Una vez en el citoplasma las ocho vRNPs que se van a empaquetar en un virus se transportan conjuntamente¹¹⁹ hasta regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol denominadas *lipid rafts*¹²⁰ a las que previamente se han anclado las proteínas HA, NA y M2¹²¹. Estas proteínas tras ser modificadas post-transcripcionalmente son transportadas a vesículas donde el canal iónico M2 aumenta el pH evitando el cambio conformacional que activaría la proteína HA. La encapsidación de las RNPs parece estar dirigida por M1 que es el principal organizador del ensamblaje de nuevos viriones, aunque también se ha implicado a M2 en este proceso^{122,123}.

El empaquetamiento del genoma viral requiere la incorporación de las 8 vRNPs para generar viriones infectivos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido de las 8 vRNPs que se seleccionan y organizan siguiendo una distribución de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una central en el interior de la partícula¹²⁴. Esta selección podría estar dirigida por secuencias en *cis* presentes en los extremos 5' y 3' de todos los segmentos genómicos^{125,126,127,128}. Estudios *in vitro* han mostrado que las RNPs interactúan de manera directa y coordinada por medio de las señales de empaquetamiento del RNA para aumentar la probabilidad de que las 8 RNPs se empaqueten juntas^{129,130}. La liberación de las partículas se produce mediante un fenómeno de gemación o *budding* en la membrana plasmática. Gracias a la acción catalítica de NA, que procesa los receptores de ácido siálico, se liberan los nuevos viriones al espacio extracelular¹³¹.

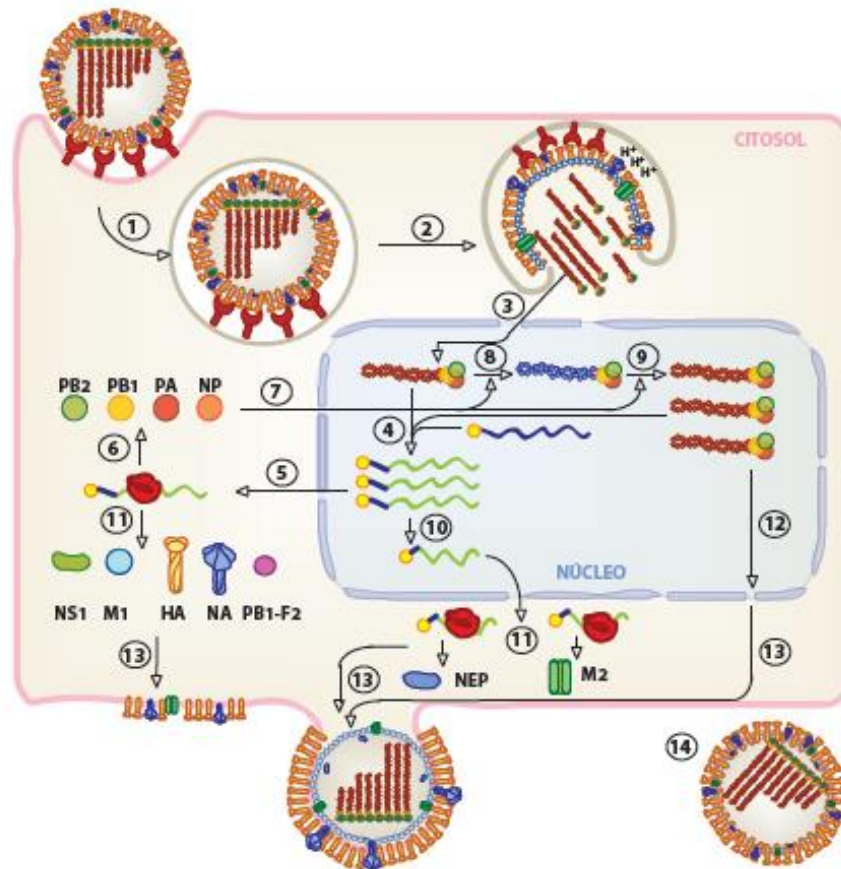


Figura 4. Se presenta el ciclo de infección viral. En donde se observa el esquema de las etapas de la infección del virus de la gripe. Se representan mRNAs virales (en verde), la maquinaria de

traducción celular (en rojo), las cRNPs (en azul) y las vRNPs (en naranja). Los números muestran las fases del ciclo de infección que se indican a continuación: (1) adsorción y entrada del virus, (2) liberación de las RNPs al citoplasma, (3) entrada de las RNPs al núcleo, (4) transcripción primaria, (5) traducción de proteínas virales, (6) transporte de las proteínas virales al núcleo y formación de cRNPs durante la replicación viral, (7) formación de vRNPs, (8) transcripción secundaria y (9) ensamblaje y liberación de viriones.

2.1.7. Variaciones menores del virus influenza (“DRIFT”) que producen la gripe estacional

Las epidemias anuales de gripe se producen como consecuencia de pequeñas variaciones en estas glicoproteínas de superficie (HA y NA): “drift” o “deriva antigénica”. Estos pequeños cambios son los responsables de la necesidad de revisar y cambiar, en caso necesario, la composición antigénica de las vacunas antigripales de cada nueva temporada invernal. La deriva antigénica ocurre por acumulación de una serie de mutaciones puntuales resultante de la sustitución de un aminoácido en los lugares antigénicos A a E de la región distal de la molécula de la hemaglutinina (llamada así por su capacidad de aglutinar hematíes). La HA es la responsable de la unión con el receptor de la célula huésped e interviene en la fusión y penetración del virus dentro de la célula. Es uno de los principales antígenos del virus y se encuentra en la superficie de las células infectadas, siendo desencadenante fundamental de la producción de anticuerpos neutralizantes. La HA se une a receptores de ácido siálico específicos de especie: en el hombre, ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa mediante enlaces tipo α -2-6, mientras que en aves y equinos son fundamentalmente de tipo α -2-3^{132,133}. La proteína tiene un extremo hidrófobo y un extremo hidrófilo y posee varios determinantes antigénicos, algunos son comunes para los subtipos y otros son específicos de especie. Actualmente en el virus de la gripe A hay descritas 16 clases de HA que se denominan de H1 a H16. En humanos se han descrito sólo unas pocas HAs, fundamentalmente H1, H2 y H3 y ocasionalmente H5, H7 y H9. Los anticuerpos dirigidos frente a HA son neutralizantes y por lo tanto tienen un papel crucial en la protección frente a la infección. Variaciones en la molécula de HA permiten al virus evadir la inmunidad preexistente.

Esta sustitución impide la función de los anticuerpos inducidos por infecciones previas. Entonces, debido a que los anticuerpos generados por la exposición a cepas previas no neutralizan las variantes antigénicas de forma efectiva, se produce una selección inmunológica y la suplantación de la cepa variante por la cepa previa y el virus puede infectar al huésped. Se trata de cambios relativamente pequeños que se producen con frecuencia (cada año o cada pocos años) en un subtipo del virus de la gripe. En el caso del virus de la gripe A de humanos y otros mamíferos, el sistema inmunológico juega un papel importante en la selección de mutantes, mientras que en el virus de la gripe A en especies de aves y virus de la gripe B y C, la selección de mutantes no tiene un papel tan importante en la emergencia de derivas antigénicas¹³⁴.

El virus de la gripe es, de entre los principales virus respiratorios el que tiene más capacidad para sufrir cambios antigénicos. Esta variación antigénica es frecuente en el virus de la gripe A, pero ocurre con menos frecuencia en el virus de la gripe B y no se ha asociado al virus C¹³⁵. En los climas templados en cualquier hemisferio, las epidemias de gripe ocurren casi exclusivamente en los meses de invierno (generalmente de Octubre a Abril en el hemisferio norte y de Mayo a Septiembre en el hemisferio sur), mientras que en los Trópicos puede suceder a lo largo de todo el año. Las epidemias en el hemisferio sur pueden predecir el tipo de virus que acontecerá en el hemisferio norte el siguiente invierno¹³⁵.

Las razones para el seguimiento de este patrón estacional de las epidemias de gripe no están claras. Parece estar relacionado con la reintroducción de los virus en cada estación, condiciones ambientales para la supervivencia del virus y cambios de conducta que favorezcan o incrementen la transmisión del virus (hacinamiento, escuelas)¹³⁶.

2.1.8. Variaciones mayores del virus influenza(“SHIFT”) que producen la gripe pandémica

Las pandemias de gripe se deben a la aparición de una cepa antigénicamente nueva (“shift”), es decir con una HA y/o NA perteneciente a un subtipo previamente no detectado en humanos, para los cuales la especie humana no tiene inmunidad. A lo largo de los siglos se han producido pandemias gripales, todas ellas causadas por el virus de la gripe A, correspondiéndose con la aparición de los subtipos H1N1 (1918, gripe española), H2N2 (1957, gripe asiática) y H3N2 (1968, gripe de Hong Kong). La primera pandemia del siglo XXI ha tenido lugar en 2009 por una variante del subtipo H1N1 [A(H1N1)v]. Las pandemias se consideran actualmente debidas a la emergencia de nuevos virus gripales. El principal mecanismo biológico responsable de este fenómeno ha sido el intercambio de genes entre cepas humanas y animales o entre cepas animales (especialmente porcinas y aviares) y su transmisión a la especie humana (cruce de la barrera interespecie)^{137,138}.

La mayor pandemia que se recuerda históricamente fue la ocurrida en 1918-1919 ya que murieron más de 20 millones de personas (tasa de mortalidad >2,5%). Las secuencias del gen de la HA del virus de la gripe del 1918 parecen claramente relacionadas con las cepas del virus gripal del cerdo. Todos los análisis filogenéticos sugieren un antepasado común aviar para ambos linajes humano y porcino^{134,139,140}. Aunque el virus de la gripe podría permanecer latente en el huésped humano y causar una pandemia años más tarde, la noción de que el virus pandémico surja de un reservorio animal es más admisible¹⁴¹. Desde 1998, se ha podido constatar la posibilidad de que el ser humano se infecte de forma directa a partir de las aves sin precisar de un período de adaptación en el cerdo; ejemplo de ello fue el brote por virus aviar H5N1 en población humana de Hong Kong en 1997 y sureste asiático desde 2003 y los casos debido a virus aviar H9N2 en China (1999) o H7N1 en Europa o Canadá (2003-2004). En estos cambios antigénicos mayores, responsables del origen de las pandemias de gripe,

se observan características comunes: su aparición brusca y que son antigénicamente distintos de los virus gripales que circularon en humanos hasta el momento. Existen varias teorías para explicar estas variaciones mayores y el posible salto de la barrera interespecie por el virus de la gripe.

2.1.9. Reordenamiento o reagrupamiento génico

Este hecho viene favorecido porque el virus tiene un genoma segmentado y porque los virus gripales A mantienen un amplio reservorio de diversidad genética en animales. Existen estudios que avalan que en 1957 y 1968 las cepas surgieron por “reagrupamiento” genético; así, el análisis extenso de secuencias significativas de estas cepas demuestran la similitud en los segmentos de los genes de la HA, NA y PB1 del virus pandémico H2N2 y los virus aviáres, y entre los segmentos de los genes H3 y PB1 del virus pandémico H3N2 y los virus aviáres, que sugieren que en algunas circunstancias, un nuevo virus pandémico surge por intercambio de genes (“reordenamiento”) entre, virus aviáres, los cuales proporcionan una nueva glicoproteína de superficie, y los virus humanos, que proporcionarían los genes que permitirán una replicación eficiente. El reordenamiento es facilitado por la presencia de una tercera especie que es susceptible de infección con ambos, virus aviáres y virus humanos, y el cerdo reúne todos estos requisitos ya que el epitelio del cerdo presenta receptores tanto para los virus aviáres como para los humanos. Esto explicaría el hecho de que las pandemias a menudo surgen en áreas geográficas donde los humanos, cerdos y aves acuáticas viven en estrecha proximidad^{142,143,144}. En el caso del virus responsable de la actual pandemia, A(H1N1)v, el análisis filogenético de los diferentes fragmentos genómicos del virus muestra un cuádruple origen. En una fase final parece haberse producido una modificación del virus porcino AH1N1 “tri-reasortante” (linaje clásico porcino norteamericano, linaje aviar norteamericano y linaje humano H3N2) que había emergido en Norteamérica en los años noventa, y que ha sustituido los segmentos correspondientes a los genes de la proteína matriz (M) y de la neuraminidasa (NA) por los del virus porcino AH1N1 de linaje euroasiático^{145,146}.

2.1.10. Transmisión directa

Otro mecanismo por el cual podría surgir un nuevo virus pandémico en la población humana, sería la transmisión directa a humanos sin intermediario. La mayor parte de estas transmisiones interespecie “no prosperan” porque los virus tienen poca capacidad para ser transmitidos secundariamente a contactos humanos y así iniciar una pandemia. La infección humana directa por una cepa de origen animal sin reagrupamiento génico se ha considerado clásicamente un hecho poco probable. No obstante, en Agosto de 1997, la OMS confirmó la identificación de un virus A (H5N1) aislado en Hong Kong de muestras respiratorias de un niño fallecido con un cuadro gripal y síndrome de Reye. Posteriormente se produjeron más casos hasta llegar a un total de 18 casos confirmados de infección humana por virus H5N1 (6 de los cuales fallecieron) a finales de enero de 1998¹⁴⁷.

Desde el punto de vista virológico, la hemaglutinina H5 que presenta el virus es de origen aviar, no aislada previamente en humanos. El análisis filogenético demuestra, que los 8 segmentos genómicos de este virus son de origen aviar, sin ninguna evidencia de reagrupamiento con virus humanos o de otros mamíferos. La caracterización genética de los virus aislados de humanos, pollos y otras especies aviares en los alrededores de Hong Kong demuestra un origen común de los virus H5N1. Posteriormente, en 1999 fueron descritos 2 casos de infección humana por virus gripal H9N2 de origen aviar en Hong Kong¹⁴⁸ y 5 casos en China causados por el mismo subtipo. En Holanda en febrero de 2003 fue descrito un brote de virus gripal A H7N7 con virulencia en granjas avícolas, donde se confirmó la transmisión a 82 personas que habían tenido contacto con las aves infectadas. La mayoría de ellas presentaron cuadros de conjuntivitis, y unas pocas presentaron síntomas de gripe.

Durante este brote se produjo la muerte de un veterinario que inspeccionó una de las granjas afectadas y cuya autopsia reveló el virus de la gripe A H7N7. Se encontraron evidencias de transmisión entre trabajadores de las granjas y sus familiares en tres casos, lo cual demostraría la posibilidad de transmisión entre personas de este virus de origen aviar. Desde 2003, se vienen detectando casos

de infección humana por virus H5N1 altamente patógeno de origen aviar, con una alta tasa de mortalidad. Los primeros casos se detectaron en Corea, para posteriormente diseminarse por el sureste asiático y después por Europa oriental y África. Desde el año 2003, hasta septiembre de 2006, ha habido un total de 241 casos con 141 muertes, lo que supone una letalidad superior al 50%. Los estudios al respecto demuestran la escasa o nula transmisibilidad entre los contactos de los individuos infectados por los subtipos H5N1 y H9N2^{149,150}. Pero no puede ignorarse que tras la trasgresión de la barrera de especie, los virus precisan de un tiempo de adaptación al nuevo huésped.

2.1.11. Patogenia de la enfermedad

El virus de influenza cuenta con distintos mecanismos de infección, adaptación y propagación que le confieren una patogenicidad particular. Existe evidencia de que un factor de patogenicidad es la habilidad del virus para adaptarse a las células del tracto respiratorio (receptores), por lo que la adaptación de la HA juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Otro factor de patogenicidad es la carga viral ya que de esto dependerá el número de células infectadas en el tracto respiratorio y por ende aumentará o disminuirá la rapidez de la propagación del virus. Por otra parte, la NA tiene un rol importante en la patogenicidad ya que gracias a esta proteína, se lleva a cabo la liberación de las partículas virales. Sin duda uno de los mecanismos de infección más importantes del virus es la habilidad para circular en tres especies distintas: en aves, cerdos y humanos. Esto le permite realizar reagrupaciones o reordenamientos de su genoma, dando lugar a cambios menores “Drift” o mayores “Shift (previamente descrito). De esta forma, logra evadir la respuesta inmunológica del huésped y además le permite desarrollar nuevas variantes del virus, que a su vez evita ser reconocido por otro huésped y así propagarse hasta lograr epidemias, o incluso pandemias. Referencia Libro de influenza

2.1.12. Complicaciones de la influenza humana

2.1.13. Tratamiento de la gripe

Existen dos clases de antivirales que se utilizan contra el virus de influenza humana, dichos antivirales tienen como blanco inhibir la proteína M2 e inhibir la proteína NA. En la década de los 60's se desarrolló y distribuyó el primer antiviral contra el virus de influenza humana, la amantadina. Que fue utilizado para combatir las infecciones contra el virus de influenza A (H2N2), posteriormente se desarrolló la rimantadina también utilizado para inhibir la proteína M2.

2.1.13.1. Antivirales Inhibidores de la proteína M2

La proteína M2 tiene como función permitir el paso de protones desde el endosoma a la parte interna del virus, lo que ocasiona una disminución del PH en el interior del virus y esto provoca la desestabilización de la interacción entre RNP y M1, además promueve un cambio conformacional en la estructura de la proteína HA, que posteriormente facilitara la fusión entre la membrana viral y la vesícula endolítica. La amantadina y la rimantadina no permiten la disminución del pH dentro del virus por lo que se ve afectado la interacción con RNP y M1 y el cambio conformacional de la proteína HA y por ello no se lleva a cabo la fusión.

2.1.13.2. Antivirales Inhibidores de la proteína Neuraminidasa

La acción catalítica de la proteína de la neuraminidasa, de procesar los receptores del ácido siálico y de esta forma se liberan los nuevos viriones al espacio extracelular, listos para infectar nuevas células. Los antivirales Oseltamivir y Zanamivir bloquean la acción de la neuraminidasa, por lo que las partículas virales no pueden liberarse de la célula hospedera, por lo tanto se ve interrumpida la replicación viral.

2.1.14. Vacunas

El uso de vacunas contra el virus de influenza en personas y poblaciones, proporciona inmunización primaria, lo cual disminuye el riesgo de infección. En la actualidad se pueden encontrar vacunas con fragmentos del virus o virus inactivo, además existen otras vacunas que presentan al virus vivo (atenuado). Las vacunas tienen como objetivo principal presentar de manera anticipada la proteína HA y la proteína NA al cuerpo, para el desarrollo de anticuerpos protectores. Teóricamente las proteínas HA y NA de la vacuna deben ser muy similares a las proteínas HA y NA de los virus circulantes. De esta manera se disminuye considerablemente el riesgo de infección.

2.2. Justificación y uso de los resultados

La influenza es una de las enfermedades infecciosas más importantes en salud pública, sobre todo desde el punto de vista de la morbilidad (es la que más casos anuales produce en México, incluso en años no muy epidémicos) y también en cuanto a las grandes repercusiones que ocasiona en la sociedad, tanto en mortalidad como por el absentismo que produce con las claras repercusiones socio-económicas que conlleva, la más importante fue la cuarentena producida en el mes de abril del 2009 en todo el país. En definitiva, los brotes de influenza ponen de manifiesto la relevancia del desarrollo de proyectos de investigación, que permitan la identificación de cepas circulantes, su diagnóstico y control de las infecciones virales por diferentes serotipos de influenza humana. Todas estas consideraciones justifican la necesidad de prestar atención y profundizar en la detección de cepas de influenza circulantes en Baja California, de una forma sencilla y de bajo costo. Por estos motivos, en este proyecto de investigación, planteamos la determinación de la seroprevalencia de distintos subtipos del virus de Influenza A en Baja California.

2.3. Pregunta de investigación

¿La caracterización antigénica de la Hemaglutinina y Neuraminidasa de diferentes subtipos de influenza humana nos permitirán identificar virus circulantes de alta patogenicidad por estudios de seroprevalencia?

2.4. OBJETIVOS

2.4.1. Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de distintos subtipos del virus de Influenza Humana circulantes en Baja California.

2.4.2. Objetivos específicos

- 1.- Estandarizar diferentes metodologías de cultivo celular y estudios de seroprevalencia para investigación en influenza humana.
- 2.- Establecer un análisis de reactividad cruzada entre subtipos virales de influenza humana.
- 3.- Estudiar la asociación con los títulos de anticuerpos de acuerdo a variables demográficas.
- 4.- Comparar la respuesta inmunológica (títulos de anticuerpos) de los participantes vacunados y los participantes no vacunados.

CAPÍTULO III.

3.1. Población de estudio

3.1.1. Selección de la Muestra

El estado de Baja California cuenta con 3,315,766 habitantes. La relación Hombre-Mujer es de aproximadamente 50% y 50% (INEGI en 2015)¹⁵¹. Para realizar el cálculo de tamaño de muestra fue necesario obtener los siguientes datos: La población actual del estado y la seroprevalencia de estudios previos que contaran con un diseño metodológico similar en otros países, a demás se requiere establecer un intervalo de confianza para este estudio fue del 95% con una precisión del 5%. Al final se obtuvo un tamaño de muestra de 380 personas.

3.1.2. Variables

Para este estudio se analizaron variables sociodemográficas como, edad, sexo, lugar de nacimiento, ocupación. Variables de sintomatología compatible con influenza como fiebre, tos y dolor de cabeza en la última semana, historial de vacunación y diagnóstico de influenza. A continuación se hace una descripción de cada una de las variables analizadas en este estudio.

Tabla II. Operacionalización de las variables.

Variable	Tipo de variable	Operacionalización	Escala
Edad	Variable cuantitativa continua	Según años cumplidos	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 12,13,14,15,16,17,18,19 20,21....
Sexo	Variable Nominal	De acuerdo a su respuesta en el cuestionario	Hombre Mujer
Ocupación	Variable nominal	De acuerdo a su respuesta en el cuestionario	
Vacunas contra influenza	Variable cualitativa dicotómica	De acuerdo a su respuesta en el cuestionario	Si No
Diagnóstico de influenza	Variable cualitativa dicotómica	De acuerdo a su respuesta en el cuestionario	Si No
Fiebre última semana	Variable cualitativa dicotómica	De acuerdo a su respuesta en el cuestionario	Si No
Tos última semana	Variable cualitativa dicotómica	De acuerdo a su respuesta en el cuestionario	Si No
Dolor de cabeza última semana	Variable cualitativa dicotómica	De acuerdo a su respuesta en el cuestionario	Si No
Título de anticuerpos: H1N1 pdm, B	Variable cualitativa ordinal	Según resultado obtenido de la prueba IH en cada uno	1:10 1:160 1:20 1:320 1:40 1:640

Victoria y B Yamagata.			1:80	1:1280
---------------------------	--	--	------	--------

Variables utilizadas en el proyecto de investigación.

3.1.3. Reclutamiento de los candidatos

Todas las personas que aceptaron participar en el estudio, recibieron información acerca del proyecto, se les realizó la lectura del consentimiento informado y se les despejaron las dudas relacionadas al proyecto. Posteriormente firmaron el consentimiento informado y se les hizo entrega de una copia del mismo. En seguida se aplicó un breve cuestionario (descrito más adelante). Finalmente un integrante capacitado del equipo de investigación realizó una extracción sanguínea de 5 ml.

3.1.4. Cuestionario demográfico

Una vez que el participante firmó el consentimiento informado se le aplicó un cuestionario demográfico breve, el cual contenía información como la edad, el sexo, la ocupación, el lugar de nacimiento y antecedentes relacionados al virus de influenza como infecciones previas, vacunación y sintomatología relacionada.

3.1.5. Diseño del estudio

Se realizó un estudio de corte transversal, analítico que se llevó a cabo en el laboratorio 3 de la Facultad de Medicina y Psicología campus Tijuana, para determinar la prevalencia de los títulos de anticuerpos contra los subtipos AH1N1 pandémico (pdm), Influenza B Yamagata e Influenza B Victoria en personas que residían en el estado de Baja California. Se emplearon frecuencias y proporciones para hacer la descripción general de los participantes, utilizando variables sociodemográficas, síntomas compatibles con la infección por influenza e historia de vacunación. Además se determinaron los títulos de anticuerpos de cada virus analizado y se empleó un análisis bivariado para comparar las variables sociodemográfica, síntomas compatibles con la infección por influenza e historia

de vacunación para así definir si hay factores asociados con los títulos de anticuerpos. Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 21.

3.1.6. Criterios de inclusión

1. Personas mayores de 18 años.
2. Ser residente del estado de Baja California.
3. Que firmen el consentimiento informado y completen el cuestionario demográfico.

3.1.7. Criterios de exclusión

1. Sufrir de un padecimiento que lo permita completar el consentimiento y el cuestionario.
2. Padecer de alguna enfermedad que no nos permita realizar la extracción sanguínea.

3.1.8. Reclutamiento de los participantes

Todas las personas que aceptaron participar en el estudio, recibieron información acerca del proyecto, se les realizó la lectura del consentimiento informado, se les despejaron las dudas relacionadas al proyecto. Posteriormente firmaron el consentimiento informado y se les hizo entrega de una copia del mismo. En seguida se aplicó un breve cuestionario y al final un integrante capacitado del equipo de investigación realizó una extracción sanguínea de 5 ml de sangre.

3.1.9. Cuestionario demográfico

Una vez que el participante firmó el consentimiento informado se le aplicó un cuestionario demográfico breve, el cual contenía información como la edad, el sexo, la ocupación, el lugar de nacimiento y los antecedentes relacionados al virus de influenza como infecciones previas, vacunación y sintomatología relacionada.

3.2. Metodología

3.2.1. Medidas de seguridad y limpieza previa a manipulación del virus de influenza

El virus de influenza es un agente biológico que durante su manejo en cada una de las etapas para su aislamiento, cosecha en embrión, cultivo celular, almacenamiento y pruebas de Hemaglutinación e Inhibición de la hemaglutinación se siguieron los protocolos de seguridad establecidos por en el manual del virus de influenza de OMS “Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza”. Por lo que se utilizaron barreras de seguridad durante cada manipulación: Traje impermeable de una sola pieza, cubre bocas N95, lentes para laboratorio y guantes de nitrilo. El manejo del virus siempre se llevó a cabo dentro de una cabina de flujo laminar clase II (CFL II). La limpieza del material se llevó a cabo mediante la esterilización en autoclave a 121°C. El equipo que no es posible esterilizar se desinfectó con etanol al 70%. La limpieza de la CFL II, antes y después de su uso, se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.2 Aislamiento del virus de influenza en embrión de huevo

Para la propagación del virus se han desarrollado dos metodologías: el aislamiento en embrión de pollo y la propagación en cultivo celular. Para incrementar el título del virus y además obtener un alto volumen del mismo a bajo costo, la metodología de elección es la propagación en embrión de pollo. A continuación se hace la descripción de dicha metodología:

3.2.3 Examinación de los embriones

Para iniciar el aislamiento del virus, se obtuvieron embriones de entre 7 y 9 días de embrionados. Cada embrión se examinó de manera exhaustiva, con la ayuda de un ovoscopio. Los embriones seleccionados debían cumplir con las siguientes características: Un cascarón sin áreas frágiles o fracturadas, fértil, es decir que tuvieran un embrión vivo, que el embrión presentara un tamaño adecuado al desarrollo normal a los 7-9 días de embrionado, que tuviera una buena irrigación sanguínea, que presentará una cámara de aire en la parte superior del huevo y

además no presentará adhesiones a los lados del huevo, es decir que el embrión no estuviera pegado al cascaron. Los embriones que no presentaron estas características fueron descartados. Una vez seleccionados cada embrión con la ayuda de un lápiz, se marcó por el borde de la cámara de aire y además se le colocó el virus a aislar. Los embriones se colocaron a 37°C hasta su utilización.

3.2.4 Inoculación de los embriones

Los virus utilizados para la inoculación tenían un título 1:16 o mayor, ya que de esta forma se asegura la obtención del mismo título o mayor. Para iniciar se retiraron los viales necesarios de congelación (-80°C). Cada uno de estos contenía a los virus A H1N1 pdm, B Victoria y B Yamagata. A continuación se colocaron en baño maría a una temperatura de 37°C hasta su total descongelamiento. Inmediatamente después, fueron retirados del baño maría y se colocaron en una bandeja con hielo para mantener los virus a temperatura baja, aproximadamente 4°C. Dentro de la CFL II, Con la ayuda de jeringas de insulina se absorbió el líquido de cada uno de los viales, por lo que cada jeringa contenía un solo virus es decir: A H1N1 pdm o B victoria B Yamagata. Posteriormente se colocaron en la bandeja con hielo hasta su utilización. Por otro parte, se retiraron los embriones de incubación y se colocaron en la CFL II; en seguida se desinfectaron con etanol al 70%, con la ayuda del ovoscopio se iluminaron para observar la cámara de aire y la posición del embrión. Con la ayuda de una aguja 18G se perforó el cascaron de un embrión previamente marcado correspondiente al virus A H1N1pdm, por lo que se tomó una de las jeringas previamente cargadas con el virus A H1N1, se introdujo la aguja aprox. 2 cm en un ángulo de 10 a 20 grados, en dirección opuesta al embrión para evitar puncionarlo y se realizó la descarga de 0.2ml del virus - La descarga del virus se realizó específicamente en el líquido alantoideo - Se retiró la aguja y se selló la perforación utilizando parafina. Las inoculaciones se llevaron a cabo de manera individual, es decir, un embrión a la vez. Previo a la incubación, se observó cada embrión utilizando el ovoscopio para asegurar que se encuentren vivos al momento de la incubación.

3.2.5. Incubación de los embriones

Los embriones que se inocularon con los subtipos H1N1 pdm se incubaron durante 48 horas a 37°C. Sin embargo los embriones que se inocularon con los subtipos B victoria y B yamagata se incubaron durante 72 horas a 35°C.

3.2.6. Cosecha del virus

Transcurrido el tiempo de incubación establecido según el subtipo del virus. Se retiraron los embriones de la incubación y se colocaron a 4°C durante 12 horas; Un método alterno para enfriar el embrión es colocarlo a -70°C durante 10 minutos y luego transferirlos a 4°C durante una hora, sin embargo se prefirió el método antes mencionado. Posterior a las 12 horas, se colocaron dentro de la CFL II para su cosecha. Utilizando el equipo personal de seguridad antes descrito, se desinfecto cada embrión utilizando una gasa impregnada con etanol al 70 %. En seguida, con la ayuda de unas tijeras afiladas se procedió a cortar el cascaron siguiendo la línea previamente marcada (cámara de aire). Con una pinza retirar la membrana que cubre el líquido alantoideo. Utilizando una jeringa de 10 mL y aguja amarilla (20 x 32) se aspiró suavemente el líquido alantoideo y éste a su vez se colocó en los tubos y micro tubos previamente rotulados. Durante la cosecha, es importante evitar forzar la salida de los fluidos con la jeringa ya que se pueden producir aerosoles. Además se debe evitar perforar la membrana amniótica, ya que contaminaría el virus que se encuentra en el líquido alantoideo. Los restos de los embriones se trataron como RPBI, por lo que fueron esterilizados y dispuestos en los contenedores correspondientes. Los líquidos cosechados se procesaron en la prueba de hemaglutinación directa y posteriormente fueron almacenados en congelación a -70 °C hasta su utilización.

3.3 Preparación de soluciones

3.3.1. Solución amortiguada por fosfato –PBS- (0.01 M, PH 7.2)

Para iniciar se debe preparar la solución A de PBS (25X), por lo que se utilizó un matraz volumétrico de 200 mL. En éste, se colocaron 170 mL de H₂O tridestilada y se agregaron 5.48 g de Fosfato de Sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄), en seguida se adicionaron 1.575 g de fosfato de sodio monobásica monohidratado (NaH₂PO₄·H₂O). Se disolvió y se aforó a 200 mL. En otro matraz aforado de un litro, para obtener la solución B (PBS 1x) se colocaron 800 mL de H₂O tridestilada. Se Agregó 40 mL de la solución A y se mezcló hasta su completa disolución. Por otra parte se pesaron 8.5 g de NaCl que posteriormente se adicionaron en la solución. Para realizar el ajuste de pH se utilizó NaOH 1N o HCl 1N. Una vez que el pH se encontraba a 7.2, utilizando H₂O destilada se aforo a 1000 mL con. Por último, la solución se esterilizó utilizando una membrana de 0.22 µm.

3.3.2. Solución de Alsever

En un matraz Erlen Mayer de un litro, se agregaron 900 mL de agua destilada, en seguida se pesaron los siguientes compuestos: 20.5 g de dextrosa, 8.0 g de citrato de sodio, 4.2 g de NaCl y 0.55 g de ácido cítrico. Se Agregó cada compuesto por separado. Por los que al agregar un compuesto, se procedió a mezclar y disolver. Una vez disuelto se agregó el siguiente, hasta disolver todos los compuestos. Se ajustó el PH a 6.1 ±0.1. Se Aforó a un litro con agua tridestilada y se esterilizó por filtración a través de membrana de 0.22 µm. Posteriormente se almacenó en refrigeración a 4°C hasta uso.

3.3.3. Suspensión de eritrocitos de pavo al 0.5 % en PBS

Para preparar esta solución se requiero la extracción de sangre venosa de pavo, dicha extracción se realiza en un ala. Como anticoagulante se utilizó la solución de Alsever con una proporción 1:1, es decir por cada mL de sangre en 1 ml de solución de Alsever. Durante cada extracción se obtuvieron 5 ml de sangre, La sangre obtenida se colocó en un tubo falcon para realizar los lavados por lo que

se centrifugo a 1200 rpm durante 5 min. Con la ayuda de una pipeta transfer desechable se retiró el sobrenadante y se re-suspendió el paquete eritrocitario con PBS al mismo volumen decantado. Se mezcló y se centrifugó de nuevo a 1200 rpm durante 5 minutos, Se repitieron los lavados en tres ocasiones. Al final se obtuvo un sobrenadante claro, el cual se descartó, para mantener solamente el paquete eritrocitario. Con una pipeta automática, se tomaron 2.5 ml del paquete eritrocitario y se colocaron en una botella de 500 mL previamente esterilizada. Posteriormente se les agregaron 247.5 mL de PBS frio, se mezcló suavemente para homogenizar. Para asegurar una correcta concentración se preparó una dilución 1:100 colocando 100 µl de la suspensión con 9.9 mL de PBS 1x frio en un tubo cónico falcón de 15 mL. Se mezcló suavemente por inversión y posteriormente se colocaron 10 µl de la dilución en una cámara de Neubauer para proceder a hacer el conteo de glóbulos rojos. El conteo celular se llevó a cabo en los cuatro cuadrantes utilizados para el conteo de glóbulos blancos. En promedio, el número esperado de cada cuadrante oscila entre 40 y 60 células. En situaciones donde no se obtuvo la concentración deseada, se agregó PBS para realizar un ajuste. Y posteriormente se verifico mediante el conteo celular. La concentración de eritrocitos de pavo al 0.5% equivale empíricamente a 4×10^7 células/ mL. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Células}}{\text{ml}} = \frac{\text{Total células contadas (dilucion)}(10^4)}{\text{No. de cuadros contabilizados}}$$

3.3.4. Tratamiento de sueros problema

Cada muestra de sangre recolectada se centrifugo a 3000 rpm durante 10 min. El suero obtenido fué tratado con una enzima destructora de receptores (RDE). Por lo que se utilizaron 100 µl de suero con 300 µl de la enzima. Posteriormente se incubaron en baño maria durante 18 horas a 37°C y se incrementó la temperatura a 57 °C en durante 30 minutos para inactivar la enzima. Para completar una dilución 1:10 se adicionaron 600 µl de solución salina fisiológica.

3.3.5. Remoción de aglutininas no específicas

Para determinar la presencia de aglutininas no específicas se procedió a realizar lo siguiente: Dentro de una campana de flujo laminar y en una placa de 96 pocillos se colocaron 25 µl de PBS frío de la fila B1 a B6 hasta llegar a H1 a H6. La columna 6 (A6 a H6) se utilizó como control de eritrocitos por lo que al pocillo A6 se le colocaron 50 µl de PBS. Se Agregaron 50 µl de los sueros tratados de la fila A1 a A5. Con una pipeta multicanal se procedió a realizar diluciones pasando 25 µl de la fila A a la B, 25 µl de la fila B a la C, 25 µl de la fila C a la D y así sucesivamente hasta llegar a la fila H. Se Descartaron 25 µl obtenidos de la fila H. Posteriormente se agregaron 50 µl a todos los pocillos utilizados, incluyendo la columna de control. Para homogenizar se impactó suavemente contra un borde. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. La lectura de los resultados se realizó de la siguiente manera: Si se observó aglutinación en la primera fila, es decir la fila A, nos indica un título 1:10, sin embargo si se observa una aglutinación en la segunda fila, es decir la fila B o en la tercera fila, es decir la fila C, indican un título 1:20 o 1:40, respectivamente y así hasta llegar a la fila H donde si se observa aglutinación equivale a un título 1:1280. Los sueros que arrojaron títulos hasta 1:20 se adsorbieron con eritrocitos de pavo.

3.3.6. Medio de crecimiento celular D-MEM

Para la preparación del medio de crecimiento se tomó un frasco con 450 ml de D-MEM, posteriormente se le agregaron 50 ml de suero fetal bovino (SFB). La concentración final fue del 10%.

3.3.7. Medio de crecimiento viral D-MEM

Se tomó un frasco con 500 ml de D-MEM y agregaron 0.5 mL de la solución de tripsin-TPCK (2 mg/mL). La concentración final fue 2 µg/mL.

3.3.8. Solución de trabajo Tripsina –TPCK

20 mg de de Tripsina-TPCK se disolvieron en 10 mL en el medio de crecimiento viral D-MEM, posteriormente se filtraron a través de una membrana con un poro de 0.22 μm y se obtuvieron alícuotas de 1.0 mL. Dichas alícuotas de congelaron a -20°C .

3.4. Titulación viral por Hemaglutinación

Se hicieron diluciones seriadas del virus en placas de microtitulación añadiendo el mismo volumen de glóbulos rojos de pavo a una concentración de 0.5% en PBS según protocolo de la OMS en el “Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza”. Se incubaron a temperatura ambiente y se observó la dilución que produce hemoaglutinación considerando el título viral por hemaglutinación a la mayor dilución del virus que produce la hemoaglutinación. La prueba de hemaglutinación se utilizó para conocer el título obtenido tanto en la cosecha de los embriones, como en cultivo celular (descrito más adelante). Para el desarrollo de la prueba, se utilizó el equipo de seguridad personal previamente descrito. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo dentro de la CFL II. Para la realización de la prueba de hemaglutinación se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en forma “v”. Para iniciar se rotularon las placas necesarias para probar las muestras obtenidas de las cosechas, La orientación de las placas es muy importante ya que nos permitió tener un mejor desempeño en el desarrollo de la prueba y en la lectura de los resultados. De tal forma que del lado izquierdo; en forma vertical se encuentran las letras de la A a la letra H y en la parte superior de forma horizontal del 1 al 12. Con la ayuda de la pipeta multicanal se colocaron 50 μL de PBS 1x partiendo de A2 a H2 y continuar hasta A10 a H10. En la columna A11 a H11 no se colocó PBS intencionadamente, finalmente en la columna A12 a H12 que se utilizó como testigo. Posteriormente se colocaron 100 μL de los líquidos a evaluar en la primera columna, es decir los pocillos A1 a H1 (8 muestras). Utilizando la pipeta multicanal, se llevaron a cabo las diluciones tomando 50 μL de la primera columna y colocando estos en la siguiente columna A2-H2, se homogenizó y se repitió el proceso hasta llegar a la columna A10-H10,

una vez en esta columna se descartaron 50 µl. Enseguida se agregaron 50 µl de la suspensión de eritrocitos de pavo al 0.5% a todos los pozos de la columna 1 a las 10 y en la columna 12. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos dentro de la campana de flujo laminar.

3.4.1 Interpretación de la titulación viral por Hemaglutinación

La lectura se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar. Para realizar la lectura se colocó la placa en un ángulo de 45° de inclinación, se observó la aglutinación y se anotaron los títulos obtenidos de cada uno de los líquidos previamente cosechados. La lectura de los títulos obtenidos se llevó a cabo de la siguiente manera: Una aglutinación en la columna 1,2,3,4,5,6,7,8,9 y 10 es equivalente a un título 1:1,1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,1:256 y 1:512, respectivamente. En cada placa se tomó como referencia la columna testigo como control de calidad de la prueba, en la cual no debía existir aglutinación. Las muestras en las cuales se obtuvo un título 1:8 o menor se inoculó de nuevo en embrión. Las muestras con títulos 1:16 o mayor se congelaron para su utilización en la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH).

3.4.2. Comprobación del título viral previo a la prueba de IH

Para el desarrollo de la prueba IH se requiere una suspensión del virus con un título 1:8 (8 unidades hemaglutinantes), por lo que aquellas muestra con un título mayor, es decir 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 o 1:512, se procedió a realizar una dilución. Para realizar la dilución se requiere un cálculo, partiendo de la dilución deseada que es 8, se divide la dilución obtenida entre la dilución deseada, por ejemplo en la muestra en donde se obtuvo un título de 1:32, este se dividió entre 8, el resultado es 4, por lo que en un tubo cónico se colocaron 1 ml de la suspensión del virus, con 3 mL de PBS, sin embargo en la muestras en las que se obtuvo un título 1:128, dividido entre 8, se obtiene 16, por lo que se colocaron 1 mL de la suspensión del virus con 15 mL de PBS o a la mitad 0.5 mL del virus más

7.5 mL de PBS. Mezclar en vortex. Para la comprobación de los títulos (1:8) se realizó de nueva cuenta la prueba de hemaglutinación con el procedimiento previamente mencionado.

3.4.3. Hemadsorción de los sueros problema

Los sueros que presentaron aglutininas inespecíficas se les realizó una hemadsorción, por lo que se tomaron 400 µl de cada suero y se colocaron en tubos nuevos previamente rotulados. Se les agregó 100 µl de eritrocitos de pavo. Posteriormente se mezclaron y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. De nuevo se re suspendió y se incubó a 4 °C durante 30 minuto. A continuación se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante en otro tubo previamente rotulado. Se recuperó un volumen entre 350 a 450 µl de cada suero. Se repitió la hemaglutinación y los sueros que presentaron una aglutinación en un título 1:20 o mayor se repitió el procedimiento de previamente descrito hasta lograr un título menor 1:20.

3.4.4. Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA)

El método de inhibición de la hemaglutinación (IHA) fue descrito por primera vez por Hirst en 1942 y posteriormente modificado por Salk en 1944. Está basado en la proteína de membrana que contiene el virus de influenza, la hemaglutinina (HA). Esta proteína se une específicamente al ácido siálico de las células del tracto respiratorio. En la prueba de IH, la HA del virus se une a una proteína similar en la membrana del eritrocito causando su aglutinación, dando así el principio de la técnica. Para iniciar se rotularon las placas de 96 pocillos con fondo “v” necesarias de acuerdo a los sueros a analizar. Dentro de la CFL II, se lo colocaron las placas de manera que en la parte superior se encontraran del 1 al 12 y en la parte vertical, es decir del lado izquierdo, se encontrara de la A a la H. Con la ayuda de la pipeta multicanal se colocaron 25 µl de PBS comenzando de B1 a H1 hasta de B12 a H12 y 50 µl en los pocillos A6 y A12. En seguida se depositaron 50 µl de los sueros tratados previamente en los pozos A1 a A5 y de

A7 a A11. Es decir se analizaron 10 sueros en cada placa. La columna 6 y la columna 12 se utilizó como control en cada placa. A continuación se realizaron diluciones seriadas pasando 25 µl de los pocillos A1 a A6 a la siguiente fila B1 a B6, y así sucesivamente hasta llegar a H1 a H6. Desechar los últimos 25 µl. Después, se agregaron 25 µl de los virus previamente estandarizados a 8 unidades hemaglutinantes a toda la placa excepto en las columnas 6 y 12. Para asegurar que todo el líquido dispensado en cada placa se encontrara en el fondo, se procedió a realizar pequeños golpes. Posteriormente se incubó a temperatura durante 15 minutos. Finalmente se agregaron 50 µl de la suspensión de eritrocitos de pavo al 0.5 % a todos los pocillos de las placas. Se taparon e incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido el periodo de incubación se procedió a realizar la interpretación de los resultados.

3.4.5. Interpretación de los resultados de IHA

Contrario a la prueba de Hemaglutinación, en la prueba de IH se esperó una no aglutinación lo cual indicaba presencia de anticuerpos en el suero problema. Para la interpretación de los resultados se colocó la placa de la misma forma en la que se realizó la prueba de IH, de tal forma que la interpretación fue de arriba hacia abajo; los sueros sin aglutinación en la fila A, tuvieron un título 1:10, sin aglutinación en la fila B, tuvieron un título 1:20, sin aglutinación en la fila C, tuvieron un título 1:40, y así sucesivamente. En el momento en que se presentó una aglutinación en un pocillo, el título asignado, perteneció al último pocillo en donde no se observó aglutinación.

3.5. Cultivo Celular

Para el cultivo del virus de influenza, en general se prefiere utilizar la línea celular Madin Darby, canine Kidney (MDCK). Un cultivo estándar toma de 4-5 días.

3.5.1. Preparación de células MDCK

La preparación de las células MDCK para su posterior infección se llevó a cabo de la siguiente manera: Se retiró el vial que contiene células MDCK, de congelación a -70°C y se colocó a baño maría a 37°C hasta su descongelación. Inmediatamente, las células se transfirieron a un frasco T-25 y se agregó 6 mL de medio de crecimiento celular D-MEM para tener un volumen final de 7 mL. Se colocaron en incubación a 37°C con CO_2 al 5%. Posteriormente se observó adherencia 1 hr de después de su incubación. Transcurridos de 3 a 4 días se observan de nuevo al microscopio para observar a que porcentaje se encuentra la confluencia celular, es decir el porcentaje de la superficie de la botella que está cubierta por las células. Las infecciones celulares se llevaron a cabo con una confluencia del 70 al 80%.

3.5.2. Inoculación de las células

Los frascos T-25 que tuvieran una confluencia celular del 70-80%, se inocularon con el virus. Primero se retiró todo el medio de crecimiento celular contenido en el frasco T-25. A continuación se inocularon 1 mL de virus a cada frasco y se incubó a 37°C durante 30 minutos para que el virus se adsorbiera. Transcurrido el tiempo se le adicionó 7 mL de medio de crecimiento viral y se incubó a 37°C al 5% de CO_2 . Posterior a la inoculación de las células, la observación al microscopio fue diaria buscando efecto citopático. En los casos en los que no se observó efecto citopático se procedió a cosechar a las 72 horas posteriores a la inoculación.

3.5.3. Cosecha del virus

Los frascos T-25 que presentaron efecto citopático o aquellos en los cuales no se observó efecto citopático, sin embargo ya había transcurrido un periodo de 72 horas posteriores a la inoculación, se procedió a realizar la cosecha. Sin tocar la mono capa celular, se retiró el sobrenadante de cada una de las botellas y se

dispensó en tubos cónicos de 15 ml. cada tubo se centrifugó a una temperatura de 4°C, a una velocidad de 3000 rpm durante 5 minutos para retirar el exceso de células. Los sobrenadantes se probaron en hemaglutinación y posteriormente se alicuotaron en viales debidamente rotulados y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

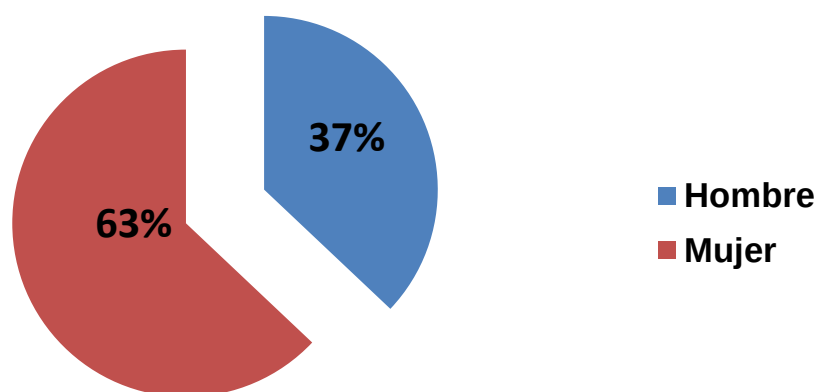
CAPÍTULO IV

4. Resultados

4.1 Características sociodemográficas

En total se reclutaron 386 participantes que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos. El promedio de edad fue de 22.1 años (DE=9.08). La proporción de hombres y mujeres se muestra en la siguiente gráfica:

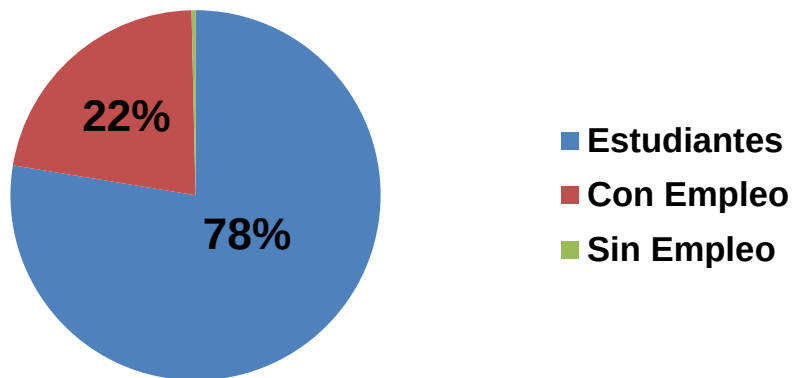
Grafica 1.Proporción porcentual por género.



La relación en este estudio de hombre-mujer fue por cada hombre reclutado se reclutaron 1.6 mujeres.

En cuanto a la ocupación de los participantes (n=290), el 78% (n=225) de ellos menciona ser estudiante, el 22%(n=64) mencionó tener un empleo (p.e. Fumigador, empacador, laboratorista, Niñera, Cajero, Medico, Maestro) y solo una persona mencionó no tener trabajo (vea figura 2).

Grafica 2. Proporción porcentual por ocupación.



La proporción de participantes en este estudio fueron en su mayoría estudiante por lo que representan el 78% del total del participantes.

Los participantes reclutados todos residen en el estado de Baja California, sin embargo no todos son originarios de este estado, un total de 168 participantes mencionaron ser de origen Bajacaliforniano, el segundo estado con mayor participación fue el estado de Sinaloa con 24 participantes, le sigue Oaxaca con 18, Guerrero con 17, Sonora con 15, Veracruz con 8, Jalisco y la Ciudad de México con 6, El estado de México con 4, Chihuahua y Durango con 3, Michoacán con 2 y Coahuila, Colima, Hidalgo, Nayarit y Zacateca son una persona cada estado. Además se tuvieron 13 participantes originarios del Estado de California EU. (Vea Tabla 3).

Tabla III. Distribución por estado natal

ESTADO	<i>n</i>	%
BAJA CALIFORNIA	168	43.0
CIUDAD DE MEXICO	6	1.6
COAHUILA	1	0.3
COLIMA	1	0.3
CHIHUAHUA	3	0.8
DURANGO	3	0.8
ESTADO DE MEXICO	4	1.0

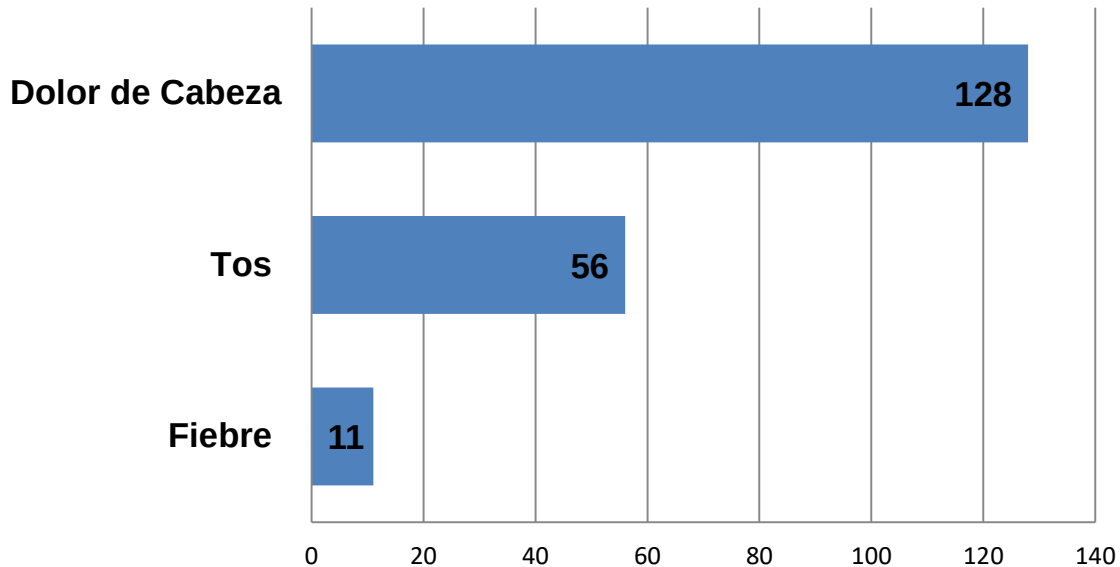
GUERRERO	17	4.4
HIDALGO	1	0.3
JALISCO	6	1.6
MICHOACAN	2	0.5
NAYARIT	1	0.3
OAXACA	18	4.7
PUEBLA	1	0.3
SINALOA	24	6.2
SONORA	15	3.9
VERACRUZ	8	2.1
ZACATECAS	1	0.3
CALIFORNIA	13	3.4
Total	293	75.8

Se omitieron aquellos estados en los cuales no hubo ningún participante

4.2 Sintomatología compatible con infección con el virus de influenza en la última semana

La sintomatología para hacer un diagnóstico de infección por el virus de influenza es muy variada, además se requieren de pruebas de laboratorio para que en conjunto con la sintomatología, se pueda establecer un diagnóstico oportuno. Para fines del estudio se evaluaron tres síntomas básicas compatibles con influenza (vea tabla 2), que los participantes tuvieron la semana previa al reclutamiento. De los participantes encuestados 128 de ellos mencionaron haber tenido dolor de cabeza última semana, 56 tos y 11 fiebre. Solo 6 participantes mencionaron tener los tres síntomas en la ultima semana.

Grafica 3. Sintomatología compatible con la infección de influenza en la última semana

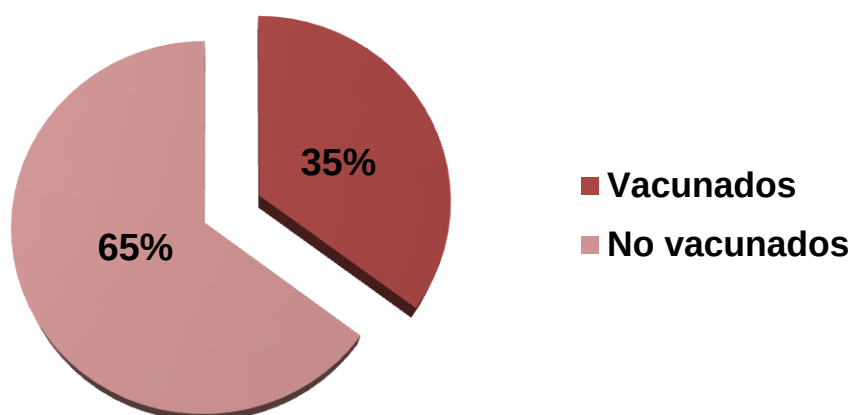


En esta grafica se observa la sintomatología básica compatible con el virus de influenza en la semana previa al reclutamiento.

4.3 Vacunación contra el virus de influenza

A raíz de la pandemia ocurrida en 2009, se han incrementado las medidas preventivas para evitar el contagio con el virus de influenza en el mundo, una de estas medidas es la vacunación. En México, la vacunación está disponible en los diferentes servicios de salud (p.e. IMSS, Secretaria de Salud, ISSTE, ISSTECALI), sin embargo realmente la vacuna se aplica a sectores vulnerables de la población como son niños, embarazada, anciano y personas con un alto factor de riesgo. En este estudio evaluamos si los participantes habían recibido la vacuna contra el virus de influenza y se encontró que solo el 35% (n=136) de los participantes había recibido la vacuna (vea figura 3).

Grafica 4. Distribución porcentual de participantes vacunados y no vacunados

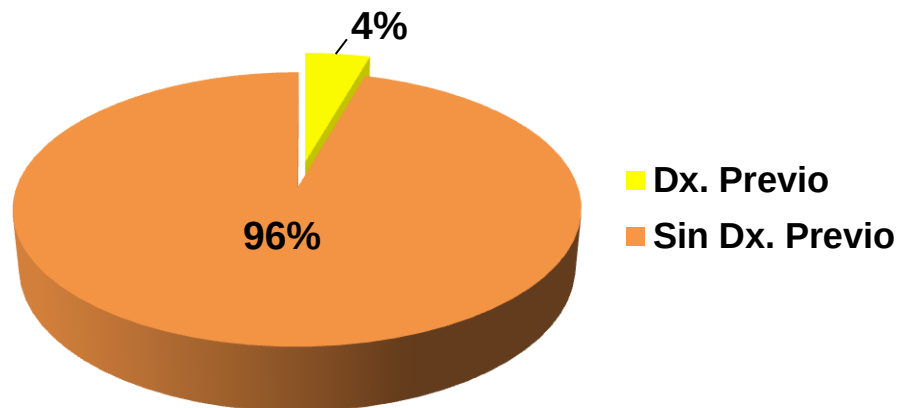


En el grafico se puede observar que solo el 35% de los participantes mencionó estar vacunado.

4.4 Diagnóstico previo de infección por el virus de influenza

Como bien se ha mencionado antes, para establecer un diagnóstico de infección por el virus de influenza se requiere de una examinación física y en ocasiones de pruebas auxiliares. Durante el reclutamiento de los participantes se les preguntó acerca de si habían tenido un diagnóstico previo de infección por el virus de influenza, se encontró que el 4.4% (n=17) había tenido una infección previa (ver figura 4).

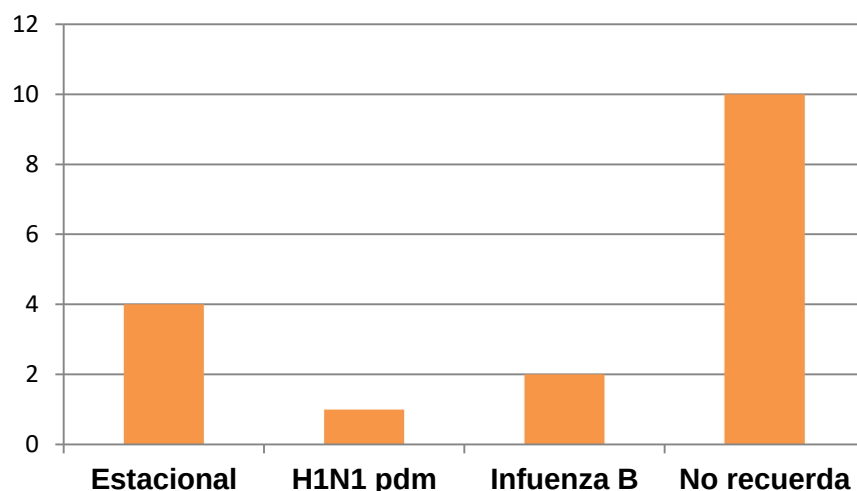
Grafica 5. Proporción porcentual de participantes con diagnóstico previo de infección por influenza.



En la gráfica se muestra la proporción de los participantes que tuvieron un diagnóstico previo de infección por influenza por lo que se el 4.4% de los participantes menciono haber padecido influenza en el pasado.

De los 17 participantes que mencionaron haber sido diagnosticados con infección por el virus de influenza, 2 fueron diagnosticados en el 2008, 4 durante la pandemia del 2009, 2 en el 2010, uno en 2012,2014, 2015 y 6 participantes mencionaron que no recordar el año de su diagnóstico. La proporción de participantes infectada con el virus estacional fue de 4 participantes, tan solo uno con el subtipo pandémico, 2 con un subtipo B y 10 participantes mencionaron que no recuerdan el subtipo del virus con el que fueron diagnosticados (ver figura 5).

Grafica 6. Proporción de participantes con diagnóstico previo de influenza por subtipo.

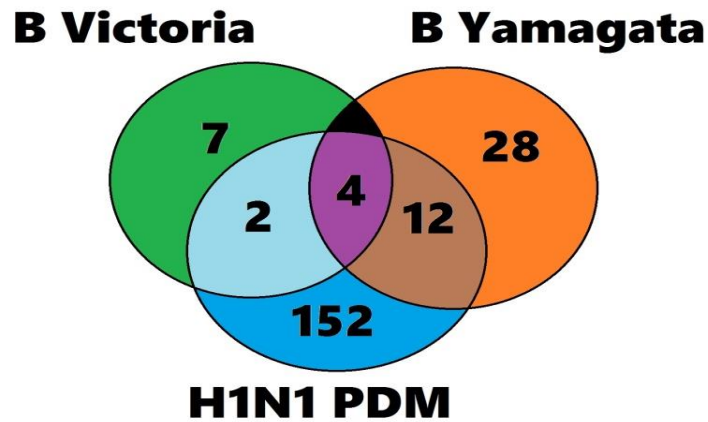


En esta grafica se puede observar que 4 personas padecieron gripe causada por el virus estacional, 1 persona causada por el virus pandémico H1N1, 2 personas por el subtipo B y 10 personas no recuerdan que tipo de gripe padecieron.

4.5 Seroprevalencia y reactividad cruzada

Tomando como referencia otros estudios en donde un resultado de un título $\geq 1:40$ se establece como un punto corte, es decir un resultado de este tipo puede disminuir hasta en un 50% la probabilidad de adquirir la enfermedad (seroprotectores). En este estudio se obtuvo una seroprevalencia del 39.4% (n=152) del subtipo H1N1pdm, 1.81% (n=7) del subtipo B victoria, 7.25% (n=28) del subtipo B Yamagata (Ver figura 6). En cuanto a la reactividad cruzada se encontró que 2 participantes tienen títulos para H1N1/B Victoria, 12 participantes para H1N1/B Yamagata y solo 4 participantes presenta títulos para los tres subtipos probados H1N1/B Victoria/B Yamagata.

Grafica 7. Distribución de seroprevalencia por subtipo



Se determinó la seroprevalencia de tres subtipos del virus de influenza, el H1N1 pdm, B Victoria y B Yamagata. En la gráfica se puede observar la proporción de los pacientes que presentan un título $\geq 1:40$ en la prueba de IH.

4.6 Participantes vacunados y no vacunados contra el virus de influenza

La proporción de los participantes vacunados en este estudio fue el 35%(n=136), de los cuales se esperaba que al menos esta cantidad presentara títulos $\geq 1:40$, sin embargo de los participantes que mencionaron haber recibido la vacuna, solo el 56.57% (n=86) presenta títulos seroprotectores con el subtipo H1N1pdm, el 71.42% (n=5) contra el subtipo B victoria y el 67.85%(n=28) contra el subtipo B Yamagata (ver tabla 2.)

Tabla 1. Distribución porcentual de seroprevalencia entre participantes vacunados y no vacunados.

	<i>H1N1 pdm</i> $\geq 1:40$ <i>N=152</i>	%	<i>B</i> <i>Victoria</i> $\geq 1:40$ <i>n=7</i>	%	<i>B Yamagata</i> $\geq 1:40$ <i>N=28</i>	%
Vacunados	86	56.57	5	71.42	19	67.85
No Vacunados	66	43.43	2	28.58	9	32.14

En esta tabla solo se incluyeron a aquellos participantes que presentaron un título $> 1:40$ en la prueba de IH.

4.7 Determinación de factores asociados contra H1N1 pdm, B Victoria y B Yamagata

Se realizó un análisis bivariado para la determinación de factores asociados a cada uno de los subtipos, en dicho análisis se incluyeron variables sociodemográficas, sintomatología compatible con la infección y vacunación e infección previa por alguno de los tres subtipos analizados. En el análisis el bivariado del subtipo H1N1 se encontró que en aquellos participantes que tuvieron un título $\geq 1:40$, presentaban mayor probabilidad de haber sido vacunados. Por otra parte no se encontró asociación en las variables sexo, edad, ocupación, sintomatología compatible con la infección, vacunación previa y diagnóstico previo (ver tabla 5).

Tabla 5. Análisis bivariado de la seroprevalencia del subtipo H1N1 pdm según variables sociodemográficas y factores de riesgo en los participantes.

Variable	H1N1 PDM				Valor de <i>p</i>
	Titulo <1:40 n=233		Titulo ≥1:40 N=153		
	n	%	n	%	
Sexo: Hombres	89	38.2	54	35.3	0.225
Mujeres	144	61.8	99	64.7	
Edad (DE)	19.65	(7.98)	17.19	(9.55)	0.285
Ocupación: Empleado	38	20.7	20	18.3	0.121
Desempleado	8	4.3	1	0.9	
Estudiante	138	75%	88	80.7	
Sintomatología compatible con influenza:					
Fiebre última semana: Si	9	4.9	2	1.8	0.208
No	175	95.1	107	98.2	
Tos última semana: Si	34	18.5	22	20.2	0.281
No	150	81.5	87	79.8	
Dolor de cabeza: Si	75	40.8	53	48.6	0.066
No	109	59.2	56	51.4	
Historial de Vacunación:					

Has recibido vacuna contra influenza : Si	71	38.6	65	59.6	<u><0.001</u>
No	113	61.4	44	40.4	
Infección previa con influenza:					
Diagnóstico de influenza: No	176	95.7	100	91.7	0.360
SI	8	4.3	9	8.3	

El Análisis de las variables se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS 21.

Respecto al análisis bivariado que se realizó para determinar factores asociados al subtipo B victoria con las variables antes mencionadas. Se no se obtuvieron factores asociados a las variables utilizadas en este modelo (ver tabla 6).

Tabla 2. Análisis bivariado de la seroprevalencia del subtipo B victoria según variables sociodemográficas y factores de riesgo en los participantes.

Variable	B victoria				Valor de <i>p</i>
	Titulo <1:40 N=376		Titulo ≥1:40 N=7		
	n	%	n	%	
Sexo: Hombres	140	36.9	3	42.9	0.440
Mujeres	239	63.1	4	57.1	
Edad (promedio) (DE)	19.79	(8.84)	27.3	(15.85)	0.155
Ocupación: Empleado	56	19.5	2	28.6	0.589
Desempleado	9	3.1			
Estudiante	222	77.4	5	71.4	
Sintomatología compatible con influenza:					
Fiebre última semana: Si	11	3.8	7	100	0.827
No	276	96.2			
Tos última semana: Si	56	19.5			0.242
No	231	80.5	7	100	
Dolor de cabeza: Si	124	43.2			0.190
No	163	56.8			
Historial de Vacunación:					
Has recibido vacuna contra influenza : Si	132	46.0	5	71.4	0.444
NO	46.0	54.0	2	28.6	

Infección previa con influenza:					
Diagnóstico de influenza: No	271	94.4	5	71.4	0.303
SI	16	5.6	2	28.6	

El Análisis de las variables se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS 21.

El análisis bivariado para determinar factores asociados al subtipo B Yamagata con las variables previamente mencionadas, se observó una asociación en aquellos que tuvieron un título $\geq 1:40$ fue más probable que estos estuvieran vacunados al compararlos con los participantes no vacunados . Además en los participantes que mencionaron ser estudiantes fue más probable que tuvieran un título $\geq 1:40$ frente al subtipo B Yamagata al compararlo con los participantes que tenían un empleo o se encontraban desempleados.

Tabla 7. Análisis bivariado de la seroprevalencia del subtipo B victoria según variables sociodemográficas y factores de riesgo en los participantes.

Variable	B yamagata				Valor de <i>p</i>
	Titulo <1:40 N=356		Titulo ≥1:40 N=28		
	n	%	n	%	
Sexo: Hombres	128	36	13	46.4	0.369
Mujeres	228	64	15	53.6	
Edad (DE)	22.30	(9.31)	20.55	(6.9)	0.346
Ocupación: Empleado	57	21.6	2	7.2	<u>0.011</u>
Desempleado	9	3.4			
Estudiante	198	75	26	92.8	
Sintomatología compatible con influenza:					
Fiebre última semana: Si	10	3.8	2	7.2	0.454
No	254	96.2	26	92.8	
Tos última semana: Si	53	20.1	4	14.3	0.346
No	211	79.9	24	85.7	
Dolor de cabeza: Si	111	42	15	53.5	0.054

No	153	58	13	46.5	
Historial de Vacunación:					
Vacuna contra influenza : SI	117	44.3	18	64.3	<u>0.018</u>
NO	147	55.7	10	35.7	
Infección previa con influenza:					
Diagnóstico de influenza: No	249	94.3	2	7.1	0.912
SI	15	5.7	26	92.9	

El Análisis de las variables se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS 21.

Las variables incluidas en esta tabla se aplicaron en el cuestionario demográfico.

CAPÍTULO V.

5. DISCUSIÓN

Alrededor del mundo se han desarrollado estudios en donde determinan la seroprevalencia de los diferentes subtipos del virus de influenza, como un estudio realizado por el investigador Cox CM. y colaboradores en Tampa Bay, Florida durante noviembre y diciembre del 2009 posterior a la declaración de la pandemia¹⁵². En este estudio su resultado de seroprevalencia contra el subtipo H1N1 pandémico fue del 30%(n=876), donde la edad de los participantes iba de los 5 años a los 56 años y además se estimó que el 5% de la población estaba vacunada. En otro estudio realizado en la universidad de Los Ángeles (UCLA) durante el 2009 en donde se reclutaron 300 estudiantes para participar en el estudio en los cuales el 20% de los participantes reportó haber recibido la vacuna contra influenza. La seroprevalencia total obtenida fue del 52.7%¹⁵³. Un estudio realizado durante 2006-2007 en Holanda por el investigador R. Bodewes y colaboradores, determinaron la seroprevalencia de los virus de influenza A y B previo a la pandemia del 2009, en niños de 6 meses a 6 años. La seroprevalencia encontrada contra el subtipo H1N1 fue de 22% y del subtipo B Yamagata fue del 15% aproximadamente¹⁵⁴.

La seroprevalencia encontrada en el estudio realizado en Tampa bay, Florida para el subtipo H1N1 pdm es similar a la encontrada en este estudio con un 30% y un 39.4% respectivamente, a pesar de la diferencia de participantes reclutados ya que en este estudio se reclutaron 386 participantes en comparación con 876 participantes. Además en ese estudio se reportó que solo el 5 % de los participantes recibieron la vacuna previamente, en comparación con los participantes de este estudio ya que el 35% mencionó haber recibido la vacuna. En cuanto al estudio realizado en la universidad de Los Ángeles se encontró una prevalencia mayor a la encontrada en este estudio, del 52.7% comparada con lo que se encontró en este estudio, una seroprevalencia del 39.4%, a pesar de que también hubo una diferencia significativa en los participantes vacunados con el 20% y 35% respectivamente. La diferencia entre las seroprevalencias de estos

estudios puede deberse a que el estudio realizado en Los Ángeles se llevó a cabo durante el 2009, época de la pandemia. Para los subtipo B, no existen muchos estudios de seroprevalencia sin embargo en el estudio realizado en Holanda durante el 2006-2007, en el cual la seroprevalencia encontrada contra el subtipo H1N1 fue de 22% y del subtipo B Yamagata fue del 15% aproximadamente similar con lo obtenido en este estudio del 29.4% y 7.25% respectivamente. Sin embargo en ese estudio se reclutaron participantes menores de edad, es decir de 0 a 7 años, comparado con el promedio de edad de nuestros participantes que es de 22 años.

CAPITULO VI.

6. Conclusiones.

-Se logró poner a punto metodologías para estandarizar técnicas de aislamiento de virus influenza en embrión de pollo y en cultivo celular.

-Se identificó una seroprevalencia del 39.4% para el subtipo AH1N1 pdm, 1.81% del subtipo B Victoria y 7.25% del subtipo B Yamagata.

-La prevalencia de la reactividad cruzada se reportó que solo 2 participantes tuvieron títulos para A H1N1/B Victoria, 12 participantes para AH1N1/B Yamagata y solo 4 participantes presenta títulos para los tres subtipos probados AH1N1/B Victoria/B Yamagata.

-El análisis bivariado se realizó para cada uno de los subtipos, para los virus AH1N1 y B Yamagata se encontró que los participantes que tuvieron un título $\geq 1:40$, presentaban mayor probabilidad de haber sido vacunados. Para el análisis del subtipo B Victoria no se obtuvieron factores asociados a las variables utilizadas en este modelo.

-Los participantes que mencionaron haber recibido la vacuna, solo el 56.57% (n=86) presenta títulos seroprotectores con el subtipo AH1N1pdm, el 71.42% (n=5) contra el subtipo B Victoria y el 67.85%(n=28) contra el subtipo B Yamagata, estos títulos en la IH se consideran seroprotectores con un título $\geq 1:40$ y se considera que disminuye en un 50% el riesgo de contraer la infección.

CAPITULO VII.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Simonsen, L., Fukuda, K., Schonberger, L.B., Cox, N.J., 2000. The impact of influenza epidemics on hospitalizations. *J. Infect. Dis.* 181, 831–837.
- 2.- Cox, N.J., Subbarao, K., 2000. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu. Rev. Med.* 51, 407–421.
- 3.-Suwannakarn, K., Chieochansin, T., Thongmee, C., Makkoch, J., Praianantathavorn, K., Theamboonlers, A., Sreevatsan, S., Poovorawan, Y., 2010. Molecular evolution of human H1N1 and H3N2 influenza A Virus in Thailand, 2006–2009.
- 4.-Taubenberger JK, Morens DM. 2006. 1918 Influenza: The mother of all pandemics.
- 5.- Chu, C., Vladimir, L., Golding, H., Betenbaugh, M., Shiloach, J., 2009. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human *siat7e* gene and its application for influenza virus production. *PNAS* 106, 14802–14807.
- 6.- Stuart-Harris, C. H., Schild, G. C., and Oxford, J. S. 1985. Influenza. The viruses and the disease, Second edition ed. Arnold Press, Victoria.
- 7.- Matsuzaki Y. *Nihon Rinsho*. 2010 Jun;68 Suppl 6:376-9. Japanese. No abstract available. Influenza A, B, C viruses.
- 8.- 1. Lamb RA, Krug RM. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; p. 1487-532.
- 9.- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333(6172): 426-431.
- 10.- Compans, R. W., Content, J., and Duesberg, P. H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* 10(4), 795-800.

- 11.-Fleury D, Barrere B, Bizebard T, Daniels RX, Skechel JJ, Knossow M. A complex of influenza hemagglutinin with a neutralizing antibody that binds outside the virus receptor binding site. *Nat Struct Biol* 1999;6:530-4.
- 12.-Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J., *et al.* (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371(6492), 37-43.
- 13.-Sugaya N, Nerome K, Ishida M, Matsumoto M, Mitamura K, Nirasawa M. Efficacy of inactivated vaccine in preventing antigenically drifted influenza type A and well-matched type B. *JAMA*. 1994 Oct 12;272(14):1122-6.
- 14.-Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*. 2005 Mar;79(5):2814-22.
- 15.-Zhong Y, Cai J, Zhang C, Xing X, Qin E, He J, Mao P, Cheng J, Liu K, Xu D, Song H. Mimotopes selected with neutralizing antibodies against Multiple Subtypes of Influenza A. *Virol J*. 2011 Dec 15;8(1):542.
- 16.-Saxena SK, Mishra N, Saxena R, Swamy ML, Sahgal P, Saxena S, Tiwari S, Mathur A, Nair MP. Structural and antigenic variance between novel influenza A/H1N1/2009 and influenza A/H1N1/2008 viruses. *J Infect Dev Ctries*. 2009 Nov 26;4(1):1-6.
- 17.-Nakajima K. The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus. *Nihon Rinsho*. 2003 Nov;61(11):1897-903. Review. Japanese.
- 18.-Lam TT, Hon CC, Pybus OG, Kosakovsky Pond SL, Wong RT, Yip CW, Zeng F, Leung FC. Evolutionary and transmission dynamics of reassortant H5N1 influenza virus in Indonesia. *PLoS Pathog*. 2008 Aug 22;4(8):e1000130.
- 19.-Chen J, Deng YM. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virol J*. 2009 Mar 13;6:30. Review.
- 20.-Kucharski A, Gog JR. Influenza emergence in the face of evolutionary constraints. *Proc Biol Sci*. 2012 Feb 22;279(1729):645-52. Epub 2011 Jul 20.

- 21.-Vila-Córcoles A, Ochoa O, Rodriguez-Blanco T, Salsench E, Hospital I, Bejarano F, Del Puy Muniain M, Fortin M, Canals M; EPIVAC Study Group. Effects of annual influenza vaccination on winter mortality in elderly people with chronic heart disease. *Eur Heart J*. 2009 Jan;30(2):209-16. Epub 2008 Nov 8.
- 22.-Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, Takada A. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One*. 2010 Jan 1;5(1):e8553.
- 23.-Stambouliau D, Bonvehí PE, Nacinovich FM, Cox N. Influenza. *Infect Dis Clin North Am*. 2000 Mar;14(1):141-66.
- 24.-World Health Organization. WHO influenza surveillance. *WHO Wkly Epidemiol Rec* 1996;71:353-6.
- 25.-Moattari A, Ashrafi H, Kadivar MR, Kheiri MT, Shahidi M, Arabpour M, Ghanbari A. Antigenic variations of human influenza virus in Shiraz, Iran. *Indian J Med Microbiol*. 2010 Apr-Jun;28(2):114-9.
- 26.-Young JF, Palese P. Evolution of human influenza A viruses in nature. Recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:6547-51.
- 27.-Bean WJ Jr, Cox NJ, Kendal AP. Recombination of human influenza A viruses in nature. *Nature* 1980;284:638-40.
- 28.-Taubenberger JK, Reid A H, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 «Spanish» influenza virus. *Science* 1997;275: 1793-6.
- 29.-Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Origin and evolution of the 1918 «Spanish» influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1651-6.
- 30.-Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918. «Spanish Flu». *Science* 2001;1842-5.
- 31.-Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PBI gene of influenza A viruses in 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989;63:4603.
- 32.-Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki M. 2009. Emergence of a novel swine origin

influenza A (H1N1) virus in humans. The New England Journal of Medicine. 360: 2605-2615.

33.-Trifonov V, Khilabanian H, Rabadan R. 2009. Geographic Dependence, surveillance and origins of the 2009 influenza A H1N1 virus. New England Journal of Medicine. 361: 115-119.

34.-Solórzano, A.; Hongyong, Z.; Fodor, E.; Brwnlee, G.; Palese y García-Sastre. (2000). Reduces levels of neuraminidase of influenza virus correlates with attenuated phenotypes in mice. J Gen Virol 81:737-42.

35.- Bardiya, N., Bae, J.H., 2005. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 299–305.

36.-Oropesa, S.; Abreu, I.; Morier, L.; Hernández, B.; González, B. y Goyenechea A. (2000) Neumonía Hemorrágica por Influenza virus. Diagnóstico virológico. Rev. Cubana MEDTROP, 52 (1), 73 – 5.

37.-Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. 1997. Initial Genetic Characterization of the 1918 Spanish Influenza Virus. Science. 275.

38.-Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Fanning TG, Zheng H, Salvatore M, Perdue ML, Swayne DE, Garcia-Sastre A, Palese P, Taubenberger JK. 2001. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. PNAS. 98 (5): 2746-2751.

39.-Taubenberger JK, Morens DM. 2006. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. Rev. Biomed. 17: 69.79.

40.-Reid AH, Fanning TG, Hulting JV, Taubenberger JK. 1999. Origin and Evolution of the 1918 Spanish Influenza virus hemagglutinin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 1651-1656.

41.-Brown IH. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. Veterinary Microbiology. 74: 29-46.

42.-Shope RE. 1931. Swine influenza, experimental transmission and pathology. J. Exp. Med. 54(3): 349-359.

- 43.-Campitelli L, Donatelli I, Foni E, Castrucci R, Fabiani C, Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. 1997. Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. *Virology*. 232: 310-318.
- 44.-Chen YJ, Li H, Shen ZY, Chen HL, Yu KZ, Bi YZ. 2005. Molecular evolution of hemagglutinin gene of H1N1 subtype swine influenza viruses isolated from the mainland of China. *Chin. J. Prev. Vet. Med.* 1: 13-17.
- 45.-Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki M. 2009. Emergence of a novel swine origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England Journal of Medicine*. 360: 2605-2615.
- 46.-Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum G, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 72: 7367-7373.
- 47.-Sancho B, Terés-Omeñaca M, Martínez-Cuenca S, Val PR, Sánchez-Villanueva P, Casas I, Pozo F, Pérez-Breña P. 2009. Human case of swine influenza A (H1N1), Aragon Spain, November 2008. *Eurosurveillance*. 14: 7:19.
- 48.-Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki M. 2009. Emergence of a novel swine origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England Journal of Medicine*. 360: 2605-2615.
- 49.-Trifonov V, Khilabian H, Rabadan R. 2009. Geographic Dependence, surveillance and origins of the 2009 influenza A H1N1 virus. *New England Journal of Medicine*. 361: 115-119.
- 50.-Moreno A, Tirani LD, Faccini S, Vaccari G, Nigrelli D, Boniotti MB, Falcone E, Boni A, Chiapponi C, Sozzi E, Cordioli P. 2011. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 VIRUS. *Veterinary Microbiology*. 149: 472-477.
- 51.- Perez P y Casas I. Infecciones producidas por los virus de la gripe aviar A (H5N1) en las poblaciones de aves del sudeste asiático y en la especie humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(7): 412-8.

- 52.- Osterhaus A, Rimmelzwaan GF, Martina B, Bestebroer TM, Ouchier R. Influenza B virus in seals. *Science* 2000; 288: 1051-3.
- 53.- Nicholls, J. M., Chan, R. W. Y., Russell, R. J., Air, G. M. & Peiris, J. S. M. (2008). Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends in microbiology* 16, 149–57.
- 54.-Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M. & other authors. (2006). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444, 378–82.
- 55.-Roberts PC, Lamb RA, Compans RW. 1998. The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinant in filamentous particle formation. *Virology*. 240: 127-137.
- 56.-Burleigh LM, Calder LJ, Skehel JJ, Steinhauer DA. 2005. Influenza A virus with mutations in the M1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *J. Virol.* 79: 1262-1270.
- 57.- Lamb RA, Krug RM. 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.
- 58.- Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou H, Barman S. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*. 143: 147-161.
- 59.- Cheung TK, Poon LL. 2007. Biology of influenza virus. *Ann. N. Y..Acad. Sci*: 1-25.
- 60.-Richardson, J. C. & Akkina, R. K. (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Archives of virology* 116, 69–80.
- 61.-Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. & Ishihama, A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* 196, 249–55.
- 62.-Enami, M. & Enami, K. (1996). Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* 70, 6653–6657.

- 63.- Ye, Z. P., Pal, R., Fox, J. W. & Wagner, R. R. (1987). Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *Journal of virology* 61, 239–46.
- 64.- O'Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO journal* 17, 288–96.
- 65.- Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. (2005). Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS pathogens* 1, e4.
- 66.- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. & Digard, P. (2009). A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of virology* 83, 8021–31.
- 67.- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. (2013). Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *Journal of virology* 87, 2455–62.
- 68.-Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333(6172): 426-431.
- 69.-Colman PM, Varghese JN, Laver WG (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303(5912): 41-44
- 70.- Varghese JN, Laver WG, Colman PM (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 303(5912): 35-40.
- 71.- Nicholls JM, Chan RW, Russell RJ, Air GM, Peiris JS (2008). Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol* 16(4): 149-157.
- 72.-Zebedee SL, Lamb RA (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* 62(8): 2762-2772.

- 73.- Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW (1994). Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* 13(13): 3158-3165.
- 74.- Holsinger LJ, Lamb RA (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183(1): 32-43.
- 75.- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69: 517-528.
- 76.- Hughey PG, Roberts PC, Holsinger LJ, Zebedee SL, Lamb RA, Compans RW (1995) Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. *Virology* 212(2): 411-421.
- 77.- Nayak DP, Hui EK, Barman S (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 106(2): 147-165.
- 78.- Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* 19(24): 6751-6758.
- 79.- Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* 16(6): 1248-1257.
- 80.- Garaigorta U, Ortín J (2007). Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleocytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* in revision.
- 81.- Garaigorta U, Falcon AM, Ortín J (2005). Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* 79(24): 15246-15257.
- 82.- Cheng A, Wong SM, Yuan YA (2009). Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res* 19(2): 187-195.
- 83.- Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Golbach R, Prins M (2004). The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* 85(Pt 4): 983-991.

- 84.-Min JY, Krug RM (2006). The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7100-7105.
- 85.-Mazur I, Anhlán D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S (2008). The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* 10(5): 1140-1152.
- 86.- Ito T. (2000). Interspecies transmission and receptor recognition of Influenza A viruses. *Microbiol Immunol.* 44:423-30.
- 87.- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333, 426–31.
- 88.- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *The Journal of cell biology* 91, 601–13.
- 89.- Sidwell, R. W., Barnard, D. L., Day, C. W., Smee, D. F., Bailey, K. W., Wong, M. H., Morrey, J. D. & Furuta, Y. (2007). Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 845–851.
- 90.- Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517–28.
- 91.- Helenius, A. (1992). Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69, 577–578.
- 92.- Cros, J. F., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2005). An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* 6, 205–213.
- 93.- Elton, D., Digard, P., Tiley, L. and Ortín, J. (2005) Structure and function of the influenza virus RNP. In Kawaoka, Y. (ed.), *Current Topics in Influenza Virology*. Horizon Scientific Press, Norfolk.
- 94.- Lamb, R.A. and Choppin, P.W. (1977) Synthesis of influenza virus polypeptides in cells resistant to alpha-amanitin: evidence for the involvement of cellular RNA polymerase II in virus replication. *J Virol*, 23, 816-819.

- 95.-Bouloy, M., Plotch, S. J. & Krug, R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 4886–4890.
- 96.-Krug, R. M., St Angelo, C., Broni, B. & Shapiro, G. (1987). Transcription and replication of influenza virion RNA in the nucleus of infected cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 52, 353–358.
- 97.- Plotch, S.J., Bouloy, M. and Krug, R.M. (1979) Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1618-1622.
- 98.-Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I. and Krug, R.M. (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, 23, 847-858.
- 99.- Scholtissek, C. & Rott, R. (1970). Synthesis in vivo of influenza virus plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics. *Virology* 40, 989–996.
- 100.- Klumpp, K., Ford, M. J. & Ruigrok, R. W. (1998). Variation in ATP requirement during influenza virus transcription. *J Gen Virol* 79, 1033–1045.
- 101.- Inglis, S. C. & Brown, C. M. (1981). Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic acids research* 9, 2727–40.
- 102.-Lamb, R. A. & Lai, C. J. (1984). Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector. *Virology* 135, 139–147.
- 103.-Lamb, R. A. & Lai, C.-J. (1982). Spliced and unspliced messenger RNAs synthesized from cloned influenza virus M DNA in an SV40 vector: Expression of the influenza virus membrane protein (M1). *Virology* 123, 237–256.
- 104.- Shih, S. R., Nemeroff, M. E. & Krug, R. M. (1995). The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6324–8.

- 105.-Poon, L. L., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (2000). Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J Virol* 74, 418–427.
- 106.-Poon, L. L. M., Pritlove, D. C., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (1999). Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* 73, 3473–3476.
- 107.- Pritlove, D. C., Poon, L. L., Fodor, E., Sharps, J. & Brownlee, G. G. (1998). Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences. *J Virol* 72, 1280–1286.
- 108.- Jorba, N., Coloma, R. & Ortin, J. (2009). Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* 5, e1000462.
- 109.- Shapiro, G. I., Gurney, T. J. & Krug, R. M. (1987). Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* 61, 764–773.
- 110.- Yángüez, E. & Nieto, A. (2011). So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus research* 156, 1–12.
- 111.- Aragón, T., De la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortín, J. & Nieto, A. (2000). Translation factor eIF4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* 20, 6259–6268.
- 112.- Chen, Z. & Krug, R. M. (2000). Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. *Trends in microbiology* 8, 376–83.
- 113.- Beaton, A. R. & Krug, R. M. (1984). Synthesis of the templates for influenza virion RNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4682–4686.
- 114.- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K. & Ishihama, A. (1988). RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)* 104, 1021–1026.
- 115.- Beaton, A. R. & Krug, R. M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6282–6286.

- 116.- Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., Zamarreno, N., Albar, J. P. & Ortin, J. (2008). Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8, 2077–2088.
- 117.- Smith, W., Andrewes, C. H. & Laidlaw, P. P. (1933). A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 1, 66–68.
- 118.- Martin, K. & Helenius, A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67, 117–130.
- 119.- Chou, Y. Y., Heaton, N. S., Gao, Q., Palese, P., Singer, R. & Lionnet, T. (2013). Localization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule 129 sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog* 9, e1003358.
- 120.-Ali, A., Avalos, R. T., Ponimaskin, E. & Nayak, D. P. (2000). Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* 74, 8709–8719.
- 121.- Nayak, D. P., Hui, E. K.-W. & Barman, S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus research* 106, 147–65.
- 122.- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K. & Kawaoka, Y. (2006). The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* 80, 5233–5240.
- 123.- McCown, M. F. & Pekosz, A. (2006). Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* 80, 8178– 8189.
- 124.- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H. & Kawaoka, Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439, 490–2.
- 125.-Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2005). Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* 79, 3766–3774.

- 126.-Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. & Kawaoka, Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2002–2007.
- 127.- Liang, Y., Hong, Y. & Parslow, T. G. (2005). cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* 79, 10348–10355.
- 128.-Liang, Y., Huang, T., Ly, H. & Parslow, T. G. (2008). Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* 82, 229–236.
- 129.-Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Cavalier, A., Rolland, J.-P., Thomas, D., Lina, B. & other authors. (2012a). Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments. *Vaccine* 30, 7359–67. Elsevier Ltd.
- 130.- Gavazzi, C., Isel, C., Fournier, E., Moules, V., Cavalier, A., Thomas, D., Lina, B. & Marquet, R. (2013). An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus. *Nucleic acids research* 41, 1241–54.
- 131.-Liu, C., Eichelberger, M. C., Compans, R. W. & Air, G. M. (1995). Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* 69, 1099–1106.
- 132.-Lamb RA and Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, 3rd edition. New York: Lippincott-Raven Press; 1996. p. 1353-1395.
- 133.- Malakhov MP, Aschenbrenner ML, Smee KF, Wandersee MK, Sidwell RW, Gubareva LV, Mishin VP, Hayden FG, Kim DH, Ing A, Campbell ER, Yu M y Fang F. Sialidase Fusion Protein as a Novel Broad-Spectrum Inhibitor of Influenza Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(4):1470-1479.
- 134.- Wright PF and Webster RG. Orthomyxoviruses. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001. p.1533-1579.

- 135.- Tenorio A, Eiros JM, Rodríguez E, Bermejo JF, Dominguez M, Vega T, Castrodeza J, Ortiz R. Vigilancia de la gripe mediante diagnóstico molecular. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22:214-220.
- 136.- Hayden FG and Palese P. Influenza virus. In richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds.): *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone; 1997. p. 911.
- 137.- Shortridge KF. The next pandemic influenza virus?. *Lancet* 1995; 346: 1210-12.
- 138.- Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell B. Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science* 2006; 312:394-397.
- 139.- Belshe R, Mendelman P, Treanor J, King J, Bruber W, Piedra P, Bernstein D, Hayden F, Kotloff K, Zangwillk, Lacuzio D . The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children. *N Engl J Med* 1998; 338: 1405-12.
- 140.- Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial Genetic Characterization of the 1918 "Spanish" Influenza Virus. *Science* 1997; 275: 1793-1796.
- 141.- Shortridge KF. The next pandemic influenza virus?. *Lancet* 1995; 346: 1210-12.
- 142.- Sugaya N, Mitamura K, Nirasawa M, Takahashi K . The impact of winter epidemics of Influenza and Respiratory Syncytial Virus on pediatric admissions to an urban general hospital. *J Med Virol* 2000; 60: 102-6.
- 143.- Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, Cheung WKTo, Ho ETF, Sung R, Cheng AFB, and members of the H5N1 study group. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998; 351: 467-71.
- 144.- Tenorio A, Eiros JM, Rodríguez E, Bermejo JF, Dominguez M, Vega T, Castrodeza J, Ortiz R. Vigilancia de la gripe mediante diagnóstico molecular. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22:214-220.

- 145.- Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. Emergence of novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in human. *N Engl J Med* 2009; 360:2605-2615.
- 146.-Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, y cols. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325(5937):197-201).
- 147.- Subbarao EK, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lin W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279: 393-6.
- 148.- Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shortridge KF. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999; 354: 916-7.
- 149.- Katz JM, Lim W, Didges CB, Rowe T, Hu-Primmer J, Lu X, Abernathy RA, Clarke M, Conn L, Kwong H, Lee M, Au G, Ho YY, Mak KH, Cox N, Fukuda K. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis* 1999; 180:1763-70.
- 150.- Uyeki TM, Chong Y, Katz JM, Lim W, Ho Y, Wang SS, Tsang TH, Au WW, Chan SC, Rowe T, Hu-Primmer J, Bell JC, Thompson WW, Bridges CB, Cox N, Mak KH, Fukuda K. Lack of evidence for human to human transmission of avian influenza A (H9N2) viruses in Hong Kong, China, 1999. *Emerg Infect Dis* 2002; 39:221-6.
151. Instituto Nacional de Estadística y Geografía consultado en: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/bc/poblacion/> 21 de marzo del 2016.
- 152.- Cox CM, Goodin K, Fisher E, Dawood FS, Hamilton JJ, Leparo GF, et al. Prevalence of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus antibodies, Tampa Bay Florida--November-December, 2009. *PloS one*. 2011;6(12):e29301. Epub 2011/12/30.

153.- Shafir SC, O'Keefe KA, Shoaf KI. Evaluation of the seroprevalence of influenza A(H1N1) 2009 on a university campus: a cross-sectional study. BMC public health. 2011;11:922. Epub 2011/12/15.

154.- Bodewes R, de Mutsert G, van der Klis FR, Ventresca M, Wilks S, Smith DJ, et al. Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses in children in Netherlands. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2011;18(3):469-76. Epub 2011/01/07.

