

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
PEDECIBA BIOLOGIA OPCION MICROBIOLOGIA

TESIS DE DOCTORADO

**Variabilidad genética y evolución
molecular de virus de la influenza A
en Uruguay**

NATALIA GOÑI MAZZITELLI

Noviembre 2011

Director: DR. JUAN CRISTINA

Realizada en : Centro Nacional de Referencia de Influenza, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, MSP y Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
LISTA DE ABREVIACIONES	7
1. INTRODUCCION AL VIRUS DE LA INFLUENZA	
1.1. Historia	9
1.2. Clasificación	11
1.3. Propagación	12
1.4. Morfología y estructura del virión	13
1.5. Organización del genoma y proteínas codificantes	15
1.5.1. Polimerasas	16
1.5.2. Hemaglutinina	17
1.5.3. Nucleoproteína	22
1.5.4. Neuraminidasa	22
1.5.5. Matriz	24
1.5.6. Proteínas no estructurales	25
1.6. Ciclo de replicación	26
1.7. Genética de los virus de la influenza	29
1.7.1. Reordenamiento	29
1.7.2. Recombinación	30
1.7.3. Mutantes termosensibles	31
1.7.4. Genética reversa	32
1.8. Epidemiología	34
1.8.1. Características clínicas y vías de transmisión	34
1.8.2. Nomenclatura de los virus de la influenza	34
1.8.3. Variaciones antigénicas	35
1.8.3.1. Deriva antigénica	35
1.8.3.2. Salto antigénico	36
1.8.4. Ecología de los virus de la influenza	37
1.8.5. Transmisión interespecie	39
1.8.6. Transmisiones transitorias de virus de la influenza aviar a humanos	40
1.8.7. Estacionalidad de los virus de la influenza	41
1.8.8. Epidemias	44
1.8.9. Pandemias	45
1.8.10. Impacto sanitario de la gripe	53
1.9. Evolución de los virus de la influenza A	54
1.9.1. subtipo H3N2	56
1.9.2. subtipo H1N1	58
1.9.3. Neuraminidasa	60
1.9.4. Comparación de los modelos evolutivos en los virus influenza A, B y C.	60
1.9.5. Variaciones en genes de proteínas internas	61

1.10. Respuesta inmune	62
1.10.1. Inmunidad humoral	62
1.10.2. Inmunidad celular	63
1.10.3. Producción de interferón	64
1.11. Prevención y control	65
1.11.1. Antivirales	65
1.11.1.1. Inhibidores de M2	66
1.11.1.2. Inhibidores de NA	70
1.11.1.3. Nuevos antivirales	77
1.11.2. Vacunas	780
1.11.2.1. Eficacia de las vacunas	79
1.11.2.2. Tipo de vacunas	80
1.12. Sistemas de vigilancia del virus de la influenza	83
2. OBJETIVOS GENERALES	85
2.1. Objetivos específicos	85
3. MATERIALES Y METODOS	86
4. RESULTADOS	100
5. DISCUSION	116
6. CONCLUSIONES	126
7. REFERENCIAS	128
8. PUBLICACIONES	150

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr Juan Cristina por permitirme continuar en su laboratorio para la realización de esta tesis, por su dedicación y constante apoyo y dirección en la elaboración de este proyecto.

A la Agencia de Investigación e Innovación (ANII) por darme la oportunidad de ser parte del Sistema Nacional de Investigadores y por permitirme ser beneficiaria de una beca de Doctorado.

Al Ministerio de Salud Pública por autorizar el uso de las muestras clínicas utilizadas en este trabajo de doctorado y por permitirme realizar parte de dicho trabajo en la institución.

A los miembros del tribunal, el Dr Rafael Radi, la Dra María Hortal y el Dr Rodolfo Campos, por haber aceptado la evaluación de esta tesis.

Al Dr. José C. Russi, por abrirme las puertas del laboratorio de Salud Pública en 2001 para realizar mi tesis de pregrado, por haberme iniciado en el mundo de la virología, especialmente en un tema apasionante como lo son los virus de la influenza.

A mis compañeros del Departamento de Laboratorios de Salud Pública, especialmente a mis compañeras “Flu” Leticia y Viviana, con quienes trabajamos a sol y sombra tanto en momentos de la pandemia 2009, así como en los años no pandémicos. A Dora, mi co-orientadora de tesis de pregrado y amiga, siempre disponible a lo largo de todos estos años, gracias por su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Virología Molecular por estar a la orden de lo que necesitara para la realización de esta tesis y por el mutuo apoyo sin el cual nuestro equipo no sería el mismo.

Al Programa PEDECIBA por haberme aceptado como estudiante de Doctorado, y a la secretaria Isolina Plata, secretaria académica, por su ayuda en todo momento.

A toda mi familia, en especial a mi padre por alentarme constantemente desde los inicios en la Facultad, y por convencerme a la hora de elegir entre la arquitectura o las ciencias, fue la mejor elección.

A Leonardo y Máximo, mis dos amores.....perdón por quitarles tiempo para la dedicación de esta tesis. A Leonardo, gracias por tu apoyo y tu gran paciencia cuando mi “locura” durante la escritura de esta tesis.

RESUMEN

Los virus de la influenza causan entre 300,000 y 500,000 muertes en todo el mundo por año, y en años pandémicos, este número puede aumentar a un millón (1957-1958) o hasta 50 millones, como se vio en la pandemia de 1918.

La mayor parte de la morbi-mortalidad causada por los virus de la influenza A puede ser evitada por la vacunación anual; sin embargo, dicha medida no está asociada con una completa protección en parte debido a la continua evolución de la estructura antigénica del virus. La frecuente generación de nuevas variantes antigénicas de los virus de la influenza A ha determinado que la vigilancia gripal sea un objetivo de salud pública prioritario a escala mundial. Por consiguiente, la caracterización genética y antigénica de cepas de virus de la influenza A es esencial para la planificación de una respuesta efectiva de prevención y control de esta enfermedad, así como para el diseño de nuevas cepas vacunales apropiadas y efectivas para las cepas circulantes.

A lo largo de esta tesis de doctorado se ha estudiado la variabilidad antigénica y genética de los virus de la influenza A mediante el análisis de secuencias de los genes de la hemaglutinina y la neuraminidasa de cepas A/H3N2 y A/H1N1pdm que circularon en la región sudamericana y se compararon con secuencias de otras partes del mundo y con las cepas vacunales correspondientes para el hemisferio sur para los años estudiados. Además se realizaron los análisis de coalescencia correspondientes con el fin de determinar la tasa de evolución y la dinámica de las poblaciones de los virus A/H1N1pdm que circularon en el año 2009.

Los resultados obtenidos en el transcurso del trabajo de doctorado permitieron extender los conocimientos acerca de cómo evolucionan los virus de la influenza A. Para los virus A/H3N2 hay migración y co-circulación de múltiples linajes, para los virus A/H1N1pdm altas tasas evolutivas y un rápido crecimiento de la población viral han contribuido durante el inicio de la pandemia.

LISTA DE ABREVIACIONES

aa	Aminoácidos
Acs	Anticuerpos
ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ARNc	Acido ribonucleico copia
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARNv	Acido ribonucleico viral
BSA	Seroalbúmina bovina
CDC	Centro para la prevención y control de enfermedades
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
EMEM	Medio esencial mínimo con sales de Earle
HA	Hemaglutinina
H1N1pdm	Influenza A subtipo H1N1 pandémica
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina tipo A
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IHA	Inhibición de la hemaglutinación
M1	Proteína de matriz
M2	Proteína de canal iónico
MDCK	Células de riñón de perro
MSP	Ministerio de salud pública
nM	Nano molar
NA	Neuraminidasa
NP	Nucleoproteína

NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
OMS	Organización mundial de la salud (WHO)
PBS	Tampón fosfato salino
rRTPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNP	Ribonucleoproteína
SFB	Suero fetal bovino
UHA	Unidades hemoaglutinantes
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius

1.1. HISTORIA

Existen testimonios de gran antigüedad que describen brotes de enfermedad respiratoria cuyas características recuerdan los cuadros gripales. Kilbourne define la gripe del siglo XX como una enfermedad invariable producida por un virus variable (Kilbourne, 1975). Si esto ha sido una constante a lo largo de la historia entonces una infección respiratoria aguda muy contagiosa identificada en el pasado, que se presentaba con síntomas de fiebre elevada, postración y se asociaba a cierta mortalidad sugiere infección gripal. No obstante, la gripe carece de síntomas patognomónicos que permitan delimitarla con total precisión en documentos históricos como es el caso de la poliomielitis, el sarampión o la viruela. La credibilidad de las fuentes históricas está por tanto oscurecida por la distancia temporal y la limitada capacidad de diferenciar las epidemias por virus de la influenza de otras plagas (Kilbourne, 1987).

Dos aspectos de la epidemiología ancestral pudieron ser relevantes en la historia de la influenza. Por un lado, si se asocia el virus con la domesticación de cerdos y aves, y por otro lado, el comportamiento epidémico de la gripe debió ser paralelo al establecimiento de núcleos de población. El advenimiento de enfermedades infecciosas es un precio que el hombre ha pagado a lo largo de la historia tras el establecimiento de grandes asentamientos humanos.

Quizás la primera pandemia de la que existe constancia es la descrita por Hipócrates en donde sugiere que los virus de la influenza A existen hace 2400 años (Kaplan y col, 1977). El descubrió una epidemia en el norte de Grecia que duró unas semanas, mató a muchos y luego desapareció. El término influenza surge en la Edad Media cuando el Papa Benedicto XIV atribuye a la “influencia” de las estrellas una epidemia de esta enfermedad en Italia.

La primera pandemia “probable” de gripe ocurrió en Europa en 1510 (Valdez y cols, 2002), pero fue en 1580 cuando aconteció la primera pandemia con acuerdo unánime entre todos los historiadores médicos (Pyle y cols, 1986). Ésta se originó en Asia, para posteriormente extenderse por África y Europa. Se caracterizó por su amplia difusión y virulencia, con tasas de mortalidad y morbilidad altas. Las pandemias se sucedieron durante los siglos XVII y XVIII, siendo la de 1830–1833 especialmente virulenta y de gran morbilidad, ya que infectó aproximadamente una cuarta parte de la población expuesta (Potter, 2006).

Las pandemias de 1889-91, 1900 y 1918-20 ocurrieron antes del aislamiento del primer virus Influenza en 1933. Sin embargo, son las primeras de las que tenemos evidencias, aunque indirectas, de la naturaleza de los virus causantes. Los subtipos asignados a los virus se han basado en estudios serológicos retrospectivos utilizando colecciones de sueros de personas ancianas.

La pandemia de 1889 se originó en mayo en Siberia y avanzó en círculos concéntricos hacia Occidente a través de Rusia. La ola inicial de 1889-90 fue seguida por una segunda y terceras olas en 1891 y 1892, marcadas por sucesivos incrementos de mortalidad (Potter y cols, 1998). Basándose en estudios seroepidemiológicos, las pandemias de 1889 y 1898 fueron asignadas a los subtipos H2N2 y H3N2 respectivamente.

La pandemia más letal y conocida fue la denominada gripe española (virus A, subtipo H1N1), que duró desde 1918 a 1919. Se denomina así porque España era el país que publicaba más datos sobre el desastre sanitario que estaba ocasionando pues muchos los censuraban con motivo de la primera guerra mundial en la cual estaban inmersos. Las estimaciones más antiguas hablaban de unos 40 ó 50 millones de muertos causados por ella (Patterson y cols, 1991), aunque las aproximaciones más actuales sitúan la cifra entre 50 y 100 millones de personas fallecidas por aquella gripe en todo el mundo (Knobler y cols, 2005). El conocimiento actual de la pandemia de 1918 es debido a la amplificación y análisis de secuencias de ARN viral obtenido de biopsias de personas que murieron de gripe en dicha pandemia. Análisis filogenéticos de las secuencias parciales o completas de distintos genes confirmó que el virus de 1918 era del subtipo H1N1 (Taubenberger, 2001).

Hasta que el primer virus de influenza de origen humano no fue aislado en 1933, era imposible determinar con certeza qué pandemias eran causadas por el virus de la influenza. Desde 1933, han habido grandes cambios antigénicos: en 1957 cuando el subtipo H2N2 reemplazó al H1N1; en 1968 cuando el virus H3N2 reemplazó a H2N2; y en 1977 cuando reapareció el subtipo H1N1.

1.2. CLASIFICACION

Los virus de la influenza forman parte de la familia *Orthomyxoviridae*, la cual comprende cinco géneros: Influenza A, Influenza B, Influenza C, virus Thogoto y los isavirus (Dannevig y cols, 1995).

Dentro de los virus de la influenza se distinguen tres tipos: A, B y C, en base a diferencias antigénicas en dos de sus proteínas (la nucleoproteína NP y la proteína matriz M). Los virus influenza tipo A se clasifican además en subtipos, en función de la naturaleza antigénica de sus glicoproteínas de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). A la fecha, los virus de la influenza A se han clasificado en 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA y más de 100 combinaciones HA-NA han sido identificadas en hospederos aviares (Alexander, 2007). Los virus clínicamente relevantes en humanos son los virus de los tipos A y B, siendo los virus de tipo A los únicos que han producido pandemias a lo largo del siglo pasado (Kawaoka Y, 2001).

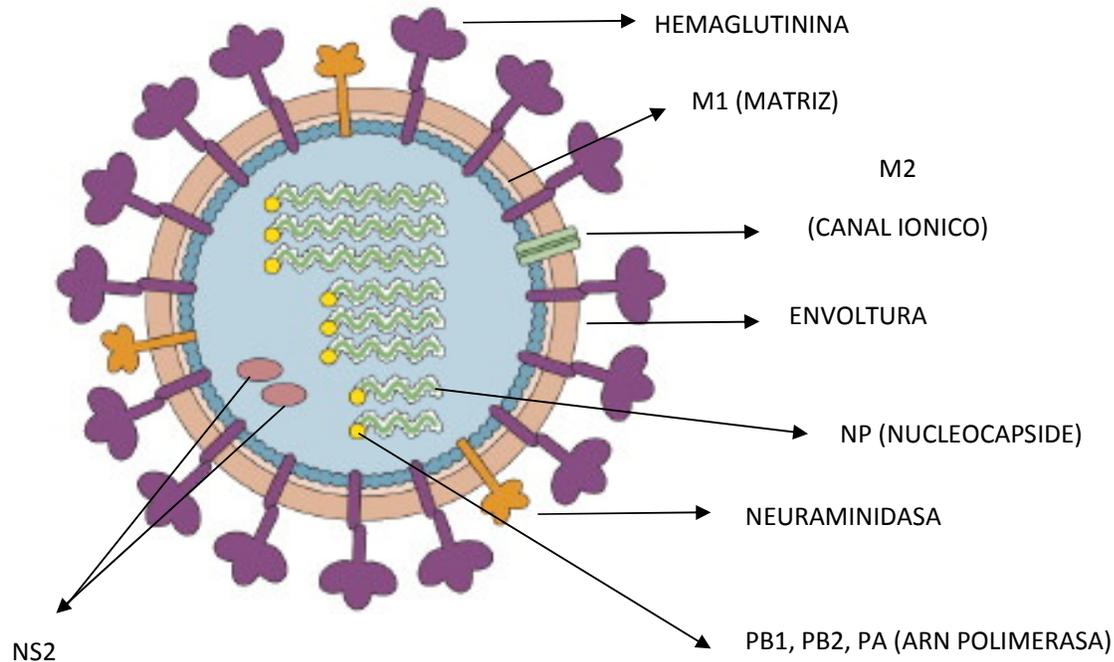


Figura 1. Estructura del virión del virus de la influenza A. (Extraído y adaptado de Flint y cols, 2000).

1.3. PROPAGACION

Los virus de la influenza pueden ser crecidos en huevos embrionados de gallina o en un gran número de sistemas de cultivos primarios. La necesidad de que la hemaglutinina se clive en sus dos subunidades para que ocurra la infectividad, ha generado una amplia disponibilidad de sistemas de cultivo para la replicación del virus. El agregado de tripsina a los cultivos de células permiten dicha clivación y por tanto la replicación y producción de placas en líneas de cultivo celular tales como las células de riñón de perro (MDCK) (Tobita y cols, 1975). Los virus de la influenza fueron primeramente crecidos en huevos embrionados (Burnet, 1936). El cultivo en huevos es aún el sistema de elección para la producción de vacunas y para la generación de grandes cantidades de virus. Muchas de las cepas de influenza A y cepas aviarias pueden ser aisladas directamente de la cavidad alantoidea de los huevos embrionados de gallina. Algunos virus de la influenza A y B necesitan ser primeramente aislados en la cavidad amniótica y subsecuentemente adaptados a crecer en la cavidad alantoidea en los embriones de pollo. La replicación en estos sistemas es detectada por la habilidad de una alícuota de este cultivo de aglutinar eritrocitos, sugiriendo la presencia de progenie viral.

1.4. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA DEL VIRION

Morfológicamente, los virus de la influenza poseen simetría helicoidal y son partículas esféricas de 80 a 120 nm de diámetro, que pueden presentarse pleomórficamente con formas filamentosas.

La superficie más externa del virus está constituida por una envoltura lipídica la cual es adquirida de la membrana plasmática de la célula que ha infectado. Al microscopio electrónico, la envoltura aparece rodeada por unas espículas o proyecciones que corresponden a las dos glicoproteínas de superficie y mayoritarias en el virión: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).

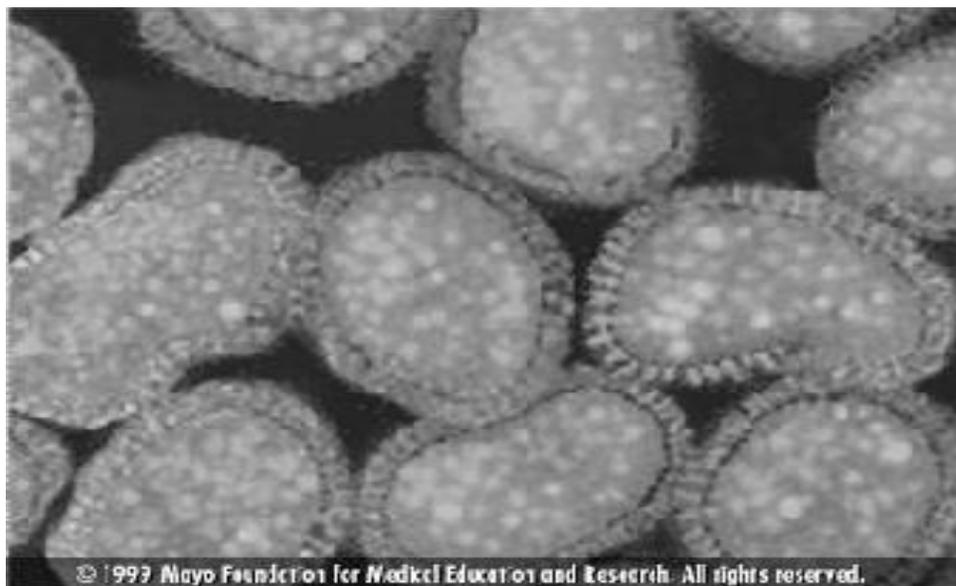


Figura 2. Microfotografía electrónica de transmisión de virus de la influenza A. (Extraída y adaptada de www.mayohealth.org/mayo/9910/htm/po991025b.htm).

Son virus que se caracterizan por poseer un genoma de ARN de simple hebra con polaridad negativa, es decir, con polaridad inversa al ARNm. Este ARN está segmentado y ello diferencia a los virus influenza A y B con ocho segmentos del virus influenza C que presenta siete segmentos. Estos segmentos independientes entre sí forman un complejo con la nucleoproteína y llevan asociada cada uno de ellos ARN polimerasa. Los ocho segmentos contienen diez genes, puesto que los últimos segmentos, 7 y 8, codifican ambos para dos proteínas distintas (tabla 1).

El tamaño total del genoma es de 12.000 a 15.000 nucleótidos y los distintos segmentos de ARN difieren en cuanto a su tamaño.

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:

1. 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.
2. Proteínas 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 1- Genoma y proteínas virales de los virus Influenza A. (Extraído y adaptado de Hay A, 1998)

Segmento	Longitud (nt)	Proteína	Tamaño (aa)	Función
1	2341	PB2	759	Transcriptasa
2	2341	PB1	757	Transcriptasa. Elongación
3	2233	PA	716	Transcriptasa. Proteasa
4	1770	HA	566	Hemaglutinina
5	1565	NP	498	Nucleoproteína. Unión a ARN. Parte del complejo de transcriptasa. Transporte nuclear/citoplasmático de ARN viral
6	1413	NA	454	Neuraminidasa: Liberación de nuevas partículas virales.
7	1027	M1	252	Proteína matriz: componente principal del virión.
		M2	96	Proteína integral de membrana. Canal para

				iones.
8	890	NS1	230	No estructural. Sólo en núcleo de células infectadas. Efecto sobre transporte, división y traducción de ARN celular.
		NS2	121	No estructural. Núcleo y citoplasma celular.

nt= nucleótidos, aa = aminoácidos

1.5. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA Y PROTEINAS CODIFICANTES

El genoma del virus de la influenza A está formado por ocho segmentos de ARN de cadena sencilla y polaridad negativa. Todos los segmentos contienen secuencias terminales conservadas en los extremos 5' y 3', que además son parcialmente complementarias y se encuentran asociadas entre sí y con el complejo de la polimerasa. Se han propuesto estructuras tipo “mango de sarten”, “tenedor” y “sacacorchos”, para la zona de interacción entre los extremos (Portela y cols, 1985)

Dentro de la célula infectada se producen tres tipos de ARN virales: vARNs, que tienen polaridad negativa y se encapsidan en los viriones de la progenie; cARNs, que son copia exactamente complementaria de los vARNs y se acumulan en el núcleo de la célula infectada y, mARNs, que son también de polaridad positiva pero se diferencian de los cARNs por ser poliadenilados en su extremo 3' y contener estructura cap en extremo 5'.

El virus de la influenza utiliza más de la mitad de su información génica para formar la maquinaria de transcripción-replicación. Los moldes funcionales para estos procesos son las RNPs, que contienen cuatro proteínas virales: la polimerasa (PB1, PB2 y PA) y la NP.

En la envoltura lipídica se pueden identificar tres proteínas de membrana: HA, NA y proteína M2. Estas proteínas presentan diferentes estados de agregación: La HA se encuentra formando homotrímeros mientras la proteína NA y M2 forman homotetrámeros. Tanto la HA como la NA están glicosiladas y contienen exclusivamente azúcares del tipo N-glicosídico, mientras que no se ha descrito glicosilación de la proteína M2. Los tres polipéptidos de la envoltura son proteínas integrales de membrana, y tienen una región que se proyecta hacia el

exterior del virión (ectodominio), una región transmembrana que atraviesa la envoltura y una región que se extiende hacia el interior de la partícula viral o cola citoplasmática.

La HA es una glicoproteína tipo I que contiene su extremo C-terminal en el interior de la partícula, mientras que la NA es una glicoproteína tipo II y tiene su extremo N-terminal intracelular. La agregación tetramérica de la proteína M2 permite que el conjunto de las regiones transmembrana forme un canal iónico que permite el paso de protones. Tanto la HA como la NA presentan dos regiones diferenciadas en el ectodominio que se proyecta hacia el exterior de la membrana: una región alargada y un dominio distal de forma globular. En estas regiones más distales reside el dominio proteico de la HA que interacciona con el receptor celular, y la región de la NA que posee la actividad de neuraminidasa que destruye el receptor celular.

En el interior de la capa de proteína M1 se encuentra el genoma viral constituido por ocho segmentos de ARN independientes. Cada uno de ellos está asociado con cuatro proteínas virales, la nucleoproteína (NP) y las proteínas responsables de la replicación y transcripción viral PB1, PB2 y PA (el complejo de la polimerasa), formando las ribonucleoproteínas virales (RNPs).

1.5.1. Polimerasas

La **polimerasa** es un heterotrímero constituido por las subunidades PB1, PB2 y PA, que están codificadas por los segmentos mayores del ARN genómico. La subunidad PB2 está codificada por el segmento 1 de ARN, el mayor de todos ellos. Es una proteína que une ARN con cap (Blas y cols, 1982) y es necesaria para la iniciación de la transcripción viral (Mahy y cols, 1983). La subunidad PB1 está codificada por el segmento 2 de ARN. Constituye el núcleo del complejo y con ella interaccionan tanto PB2 como PA (Digard y cols, 1989). La subunidad PB1 es la más conservada evolutivamente y es responsable de la actividad de polimerización. La proteína PB1-F2 ha sido descrita recientemente (Chen y cols, 2001). Está codificada por un marco de lectura alternativo del segmento 2 del ARN. Su papel en la virulencia estaría relacionado con la inducción de apoptosis en células del sistema inmune, haciendo que la eliminación del virus sea menos eficaz (Chen y cols, 2001). Por otra parte, la

subunidad PA está codificada por el segmento 3 de ARN. Es una fosfoproteína que tiene una actividad proteasa implicada en la replicación del ARN viral (Perales y cols, 2000).

1.5.2. Hemaglutinina

La HA está codificada por el segmento 4 de ARN. Es la glicoproteína más importante y constituye alrededor del 40% de las proteínas del virus. Tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos por unión a los residuos de ácido siálico presentes en los receptores celulares. La HA desempeña dos funciones esenciales en la infección viral al ser responsable de la unión al receptor -ácido siálico- en la superficie de la célula susceptible y de la fusión de membranas viral y celular que determina la penetración del genoma viral en la célula infectada. Además, la HA es uno de los antígenos virales contra los que se dirige una parte importante de la respuesta inmunológica neutralizante. El reconocimiento de los anticuerpos por la HA está altamente correlacionado a los cambios conformacionales en los sitios antigénicos (epítopes) de la proteína. La mayor parte de los epítopes se concentran en la región HA1 de la proteína, la cual es la responsable de la antigenicidad. La HA tiene cinco epítopes variables (A, B, C, D y E), cada uno con aproximadamente veinte aminoácidos localizados en la superficie de la proteína. Los epítopes dejan entre sí un bolsillo estable (en el que se localizan residuos de aminoácidos esencialmente conservados entre las distintas cepas virales), el verdadero receptor viral, donde se asienta el ácido siálico celular (Paglini S, 1999). Este hueco es inaccesible a unión por anticuerpos, pero las regiones circundantes están muy expuestas y constituyen las zonas inmunodominantes en la respuesta humoral del hospedador. La HA2 contiene la cola citoplasmática y la región hidrofóbica que permite el anclaje de la HA en la membrana. La exposición de la HA a bajos pH lleva a cambios conformacionales irreversibles que activan la capacidad de fusión del virus permitiendo que el extremo amino, altamente hidrófobo de la proteína HA2, ejerza su función de fusión de membrana y para que así el virus penetre en las células y se replique (Garten W. y col., 1999).

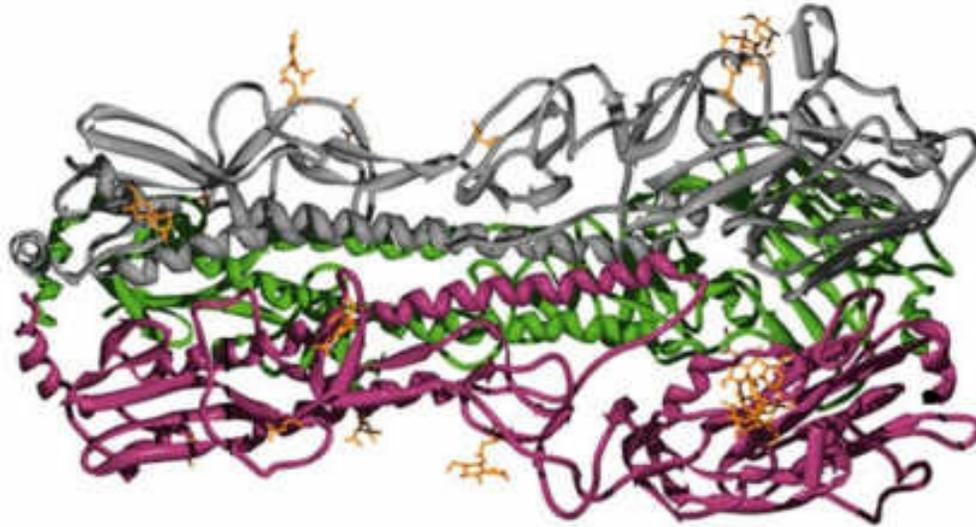


Figura 3. Estructura de la proteína HA. Una molécula de hemaglutinina es en realidad una combinación de tres proteínas idénticas (ilustradas aquí en gris, verde y violeta) que se unen formando una forma cilíndrica alargada. Una mutación que cambia solamente un aminoácido en la estructura de estas proteínas puede alterar considerablemente las propiedades antigénicas. (Extraído y adaptado de Gamblin y col, 2010).

Rol de la hemaglutinina en la patogénesis

Conocer sobre la influenza aviar es relevante para la enfermedad humana ya que algunos mecanismos para la patogenicidad en aves también opera en mamíferos y porque el origen de cepas que causaron pandemias en humanos provinieron de poblaciones de aves, como lo sucedido en 1957 y 1968 (Kawaoka Y. y cols., 1989).

Debido a que el tropismo tisular y la capacidad para la dispersión sistémica son los determinantes más importantes para la patogénesis de la influenza aviar, la HA juega un rol importante. La HA es una glicoproteína de membrana tipo 1 que específicamente se une a receptores de la superficie celular conteniendo ácido siálico. Luego de la endocitosis, la HA media la fusión de las membranas celular y viral. Una vez que la célula huésped está infectada, se sintetiza la HA como un polipéptido precursor (HAo) el cual es clivado por proteasas del hospedador en residuos conservados de arginina en 2 subunidades; HA1 y HA2 unidas ambas por un enlace disulfuro. El clivaje de HAo es necesario para activar la fusión de la envoltura viral y la membrana del endosoma (Klenk H. y cols., 1975; Lazarowitz S. y col., 1975) y por tanto es un determinante crítico en la patogenicidad y difusión de la infección

(Lamb R., 1989). El tropismo tisular de los virus de la influenza y la capacidad para una dispersión sistémica dependen de la habilidad de receptores HA funcionales en la célula huésped, en la distribución de proteasas del hospedador capaces de clivar HAo y de las propiedades de clivaje del precursor de HAo (Steinhauer D., 1999) así como también de la permisibilidad de la célula para la replicación viral. Las hemaglutininas de virus aviar no virulentos son usualmente clivados solo en un número limitado de tipos celulares, de manera que los virus causan infecciones localizadas en el tracto respiratorio o intestinal, o ambos, resultando en una infección leve o asintomática. En cambio, las hemaglutininas de virus aviar virulentos son clivados en un amplio rango de células diferentes del huésped y por tanto son capaces de causar infecciones sistémicas letales en aves.

La clivabilidad de la HA es uno de los determinantes principales del tropismo tisular de los virus de la influenza y sugiere que las diferencias en la distribución de los tejidos de las proteasas y la susceptibilidad de la HA a estas enzimas determinan el éxito de la infección.

Reconocimiento del receptor

El receptor celular que necesita la HA viral para poder unirse a la célula susceptible y comenzar la multiplicación viral es el ácido siálico. El mismo está unido a la galactosa mediante una unión α (2,3); algunos subtipos de HA se unen preferentemente mediante unión α (2,6). La proteína NA es la encargada de clivar las uniones glicosídicas del ácido siálico (Flint S. y cols., 2000).

Las hemaglutininas de los virus de aves y equinos se unen preferencialmente a receptores con terminaciones α (2,3), mientras los virus humanos se unen a receptores con terminaciones α (2,6) (Rogers G. y col., 1983). La predominancia de estos receptores en los diferentes tejidos refleja el tropismo del virus en las diferentes especies. La habilidad de ambos virus (aviar y humano) de infectar cerdos se considera como resultado de la presencia de ambos tipos de uniones en las moléculas de la superficie celular de la tráquea de los cerdos (Ito T. y cols., 1998). Los factores determinantes del rango de tejidos en donde la replicación del virus en mamíferos tiene lugar no está claro, aunque parece que las propiedades de unión al receptor de los virus de la influenza y los receptores presentes en las superficies celulares de mamíferos son los determinantes principales (Suzuki Y. y cols., 2000) así como la permisividad de los tipos celulares de los mamíferos para la replicación.

Secuencia de clivaje de la hemaglutinina

Son dos las características estructurales que determinan la clivabilidad de la HA: la secuencia aminoacídica en el sitio de clivaje y los carbohidratos presentes en la vecindad del sitio de clivaje. Las hemaglutininas no virulentas tienen una única arginina mientras que las hemaglutininas virulentas tienen múltiples residuos básicos situados inmediatamente del sitio de clivaje (Bosch F. y cols., 1981), lo cual resulta en una alteración de la estructura tridimensional alrededor del sitio de clivaje, haciendo a la HA más susceptible a la acción de proteasas (Steinhauer D., 1999). Los virus de la influenza en humanos carecen de secuencia aminoacídica polibásica en la región C-terminal de HA1 la cual se forma luego del clivaje de HAo. Teóricamente, una secuencia de residuos básicos puede ser introducida a un virus tipo A humano alterando el tropismo y patogenicidad. La presencia de una secuencia polibásica en la HA del subtipo H5N1 (Claas E. y cols., 1998), está implicada en el alto grado de patogenicidad reportado de ese subtipo en humanos. Afortunadamente, los virus H5N1 se transmiten pobremente entre las personas, quizás como resultado de la especificidad del receptor de la HA del subtipo H5N1; los aislados humanos se unen preferencialmente a receptores con terminaciones en α (2,6) unidas al ácido siálico (Deshpande K. y cols., 1987; Matrosovich M. y cols., 1999).

El interjuego entre las secuencias del sitio de clivaje y una cadena de carbohidratos en la vecindad determina la susceptibilidad de la HA a las proteasas ubicuas (por ejemplo su clivabilidad); la cadena de carbohidrato interfiere con la accesibilidad de la HA a las proteasas (Kawaoka Y. y col., 1988; Deshpande K. y cols., 1987).

Los virus de la influenza virulentos y no virulentos se diferencian además en la proteína M2, lo cual puede ser explicado debido a posibles diferencias entre ambos virus en la habilidad de la proteína M2 en evitar un cambio conformacional inducido por un pH bajo en la HA clivada de los virus virulentos (Hay A. y cols., 1985; Takeushi K. y col., 1994), aunque las bases moleculares para dicha diferencia aún no son claras.

Clivaje proteolítico de la HA

Las proteasas responsables del clivaje de la HA pertenecen a la familia de las serin-proteasas, pero esta familia de enzimas difiere en sus especificidades respecto a cada sustrato. Esencialmente, diferentes proteasas clivan moléculas de HA las cuales contienen muchos residuos polibásicos en el sitio de clivaje, comparado con moléculas de HA que no contienen residuos polibásicos, y la distribución de estas proteasas en los distintos tipos celulares ayuda a determinar el tropismo del virus. Las proteasas responsables del clivaje de la HA de virus no virulentos están restringidas a las células epiteliales del tracto respiratorio o gastrointestinal; mientras que las proteasas capaces de activar HA virulentas están en todos lados.

Las hemaglutininas de los virus aviares virulentos son clivadas por proteasas llamadas subtilisinas. La serin-proteasa de aves es la furina y también la PC6. La subtilisina reconoce secuencias di o polibásicas, siendo incapaces de clivar una única arginina en el sitio de clivaje de las hemaglutininas en virus no virulentos. La amplia distribución de la furina y PC6 en aves permite que se active la clivación de la HA en todo tipo celular en las aves, llevando a sitios múltiples de replicación. La falta de cadenas de carbohidratos cercanas a la región de clivaje de la HA, lleva a una mayor accesibilidad de la proteasa al sitio de clivaje.

Los virus de la influenza A en mamíferos se asemejan a los virus aviares no virulentos ya que poseen un clivaje restringido. Estas hemaglutininas con sitios de clivaje monobásicos son clivadas extracelularmente por serin-proteasas como la tripsina. La activación se lleva a cabo en proteasas de células epiteliales e inflamatorias del huésped y proteasas bacterianas. No se conoce en mamíferos, la naturaleza de las proteasas responsables del clivaje de la HA (Zambon M., 2001).

La unión de proteasas del hospedador a la neuraminidasa viral para asistir a la activación de la HA, el acortamiento de la NA y sustituciones en el gen de la polimerasa, PB2, han sido todos sugeridos como una alternativa molecular que se correlacionan con la patogenicidad de los virus de la influenza en humanos. Además, la dispersión sistémica en humanos de subtipos patógenos no se ha demostrado y factores del hospedador como lo son los interferones son cruciales para evitar el esparcimiento del virus fuera del tracto respiratorio.

1.5.3. Nucleoproteína

La nucleoproteína **NP** está codificada por el segmento 5 de ARN. Es una proteína rica en arginina, glicina y serina con carga neta positiva a pH neutro pero con un acúmulo de aminoácidos en su extremo N-terminal. Es el componente más abundante de las RNP y es bastante conservada evolutivamente entre las diferentes cepas virales. La NP interacciona con el ARN con una afinidad considerable pero sin ninguna especificidad de secuencia (Baudin y cols, 1994). La región más importante para esta interacción ha sido localizada en la secuencia N-terminal de la proteína (Albo y cols, 1995), pero la NP establece interacciones con el ARN a través de residuos situados a lo largo de toda la molécula (Elton y cols, 1999). Además de estas interacciones típicas de una proteína que forma RNPs, la NP establece contactos específicos con la polimerasa a través de sus subunidades PB1 y PB2 (Biswas y Cols, 1998).

La NP posee señales cariofílicas (afinidad por el núcleo) y se acumula en el núcleo; tarde en la infección migra al citoplasma, presumiblemente como componente de las RNP.

1.5.4. Neuraminidasa

La neuraminidasa NA está codificada por el segmento 6 de ARN. Como lo dice su nombre, presenta actividad neuraminidasa (N-acil-neuramidil-hidrolasa) y representa alrededor de un 5 % de las proteínas totales del virión. La neuraminidasa también se llama sialidasa porque disuelve los enlaces químicos entre el ácido siálico y las glicoproteínas o glucolípidos que se encuentran en las paredes celulares. Mediante la difracción de rayos X se ha determinado la estructura tridimensional de la NA. Cada monómero de NA se dobla en seis hojas beta antiparalelas topológicamente idénticas arregladas de tal manera que forman como las hélices de un propulsor (Varghese J. y cols., 1983). El tetrámero resultante se asemeja a cuatro globos colocados encima de un eje. El eje único penetra la membrana vírica y los globos sobresalen, Cada monómero de NA muestra una hendidura central profunda en su superficie (sitio activo de la enzima que consiste en un hueco formado por aminoácidos conservados entre las distintas cepas virales). Análogo a lo hecho para la HA, se mapearon sitios antigénicos en NA mediante análisis de cambios en cepas naturales y en variantes seleccionadas con anticuerpos monoclonales. Se han identificado cuatro sitios antigénicos en

el virus de la influenza A, cada uno consistiendo en múltiples epítopes contra los que se dirige la respuesta humoral neutralizante (Colman y cols, 1983; Webster R. y cols., 1984).

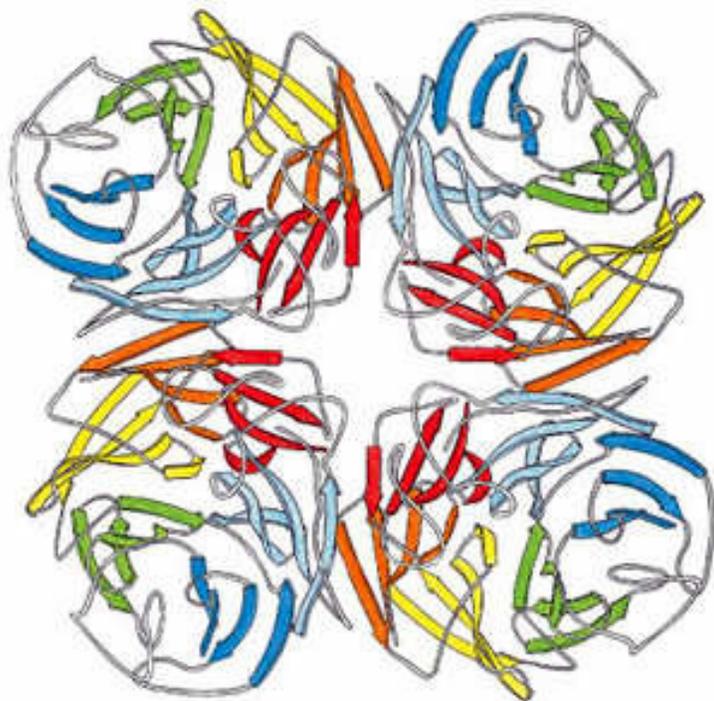


Figura 4. Estructura de la proteína NA. Las moléculas de neuraminidasa forman unas proyecciones sobre la superficie del virus de la influenza en forma de hongo. En la figura se observa la parte superior de la proteína. La misma consiste de cuatro proteínas idénticas con una forma aproximadamente esférica. (Extraído y adaptado de Hensley y cols, 2011)

Mientras la distribución de la HA sobre la superficie de la partícula del virus de la influenza es regular, la NA tiende a localizarse en la región de la envoltura donde la partícula viral brotante se separa de la membrana celular. Debido a su actividad sialidasa, esta proteína es responsable de la destrucción de actividad del receptor del virus necesaria para la liberación de los nuevos virus formados.

También favorecen la adhesión del virus a las células del hospedador al inactivar las secreciones de las células endoteliales.

Las funciones biológicas de la NA parecen muy importantes en el ciclo replicativo del virus de la influenza. Palese y cols (1976), demostraron que el cultivo de virus de la influenza en presencia de inhibidores enzimáticos daba como resultado un único ciclo replicativo viral ya que la progenie vírica generada quedaba inmovilizada en la superficie de la célula infectada. La NA no juega ningún papel en la fusión y penetración, pero interviene de forma decisiva en las últimas etapas del ciclo y específicamente en la liberación del virus desde la célula infectada y por consiguiente en su difusión de célula a célula. La razón por la cual la liberación de estos virus requiere una enzima especial es que sus hemaglutininas poseen una fuerte afinidad por los residuos de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) ubicados en los extremos de las cadenas oligosacáridas. Al hidrolizarlas la enzima permite la liberación de las partículas virales que de otra forma no serían liberadas, sino reabsorbidas inmediatamente después de ser liberadas o se agregarían entre sí.

1.5.5. Matriz

La proteína **M1** es la proteína más conservada del virus y está codificada por el segmento 7 de ARN. Posee dos dominios cuya conformación relativa es flexible. Una de las superficies de la misma está fuertemente cargada positivamente (Sha y cols, 1997) y es probablemente responsable de su unión a ARN, mientras que la superficie opuesta es hidrofóbica y sería responsable de la interacción con las membranas. Aunque esta proteína se localiza mayoritariamente en el citoplasma de la célula infectada, posee una señal de localización nuclear y aparece en el núcleo en los primeros tiempos de la infección. La proteína M1 es el factor esencial en la formación de partículas virales, hasta el punto que su sola expresión puede dar lugar a pseudopartículas de morfología análoga a los viriones (Gomez-Puertas y cols, 1999).

La proteína **M2** está codificada por un ARNm empalmado derivado del segmento 7. Es una proteína integral de membrana que se expresa de forma abundante en la membrana plasmática de la célula infectada (Lamb y cols, 1985). También está presente en el virión pero en menor cantidad, por lo que se piensa existe un mecanismo de exclusión de M2 durante la morfogénesis del virión. La forma biológicamente activa de la proteína es un tetrámero en el

que los monómeros están unidos por puentes disulfuro por su zona N-terminal (Holsinger y cols, 1991). Las regiones transmembrana de los monómeros forman un canal iónico el cual se activa a pH ácido y es fuertemente selectivo para protones (Mould y cols, 2000). El canal iónico se puede inhibir por amantadina, un antiviral específico para el virus de la influenza A. Se han aislado cepas resistentes al inhibidor cuyas mutaciones se localizan en la proteína M2, a lo largo de la región transmembrana (Hay y cols, 1985).

1.5.6. Proteínas no estructurales

Las proteínas NS1 y NS2 están codificadas por el segmento 8, a partir del transcripto primario y del transcrito procesado, respectivamente (Lamb y cols, 1980).

La proteína NS1 es una proteína no estructural codificada por el virus de la influenza. Se expresa a tiempos tempranos de la infección viral, momento en el que se localiza esencialmente en el núcleo (Portela y cols, 1985), mientras que a tiempos posteriores se localiza en citoplasma celular asociándose a polisomas (Falcon y cols, 1999). La proteína contiene dos señales de transporte al núcleo que son redundantes y además presenta una señal de exportación nuclear (Li y cols, 1998). También funciona como antagonista viral de interferón (IFN) mediante el bloqueo de la cascada de IFN, provocada por la infección viral, en fases tempranas de la expresión génica de IFN. Neutraliza señales inducidas por los ARN de doble cadena formados que llevan a cabo la defensa antiviral en las células infectadas por el virus Influenza (Dauber y cols, 2004; Yuan y cols, 2001).

La proteína NS2 interacciona con nucleoporinas y con el factor de exportación nuclear CRM1 (Neumann y cols, 2000). Tiene un papel principal en la exportación de RNP desde el núcleo para su interacción con la proteína M.

Es sintetizada de forma tardía en la infección y empaquetada en los viriones luego del transporte núcleo-citoplasmático. Permanece asociada a las RNP luego de la separación entre la proteína de matriz (M) y las RNP, mientras que en los virus de la influenza A, la proteína NS2 es fácilmente separada de las RNP y permanece asociada con M (Imai y cols, 2003).

1.6. CICLO DE REPLICACION

La replicación de los *Orthomyxovirus* tiene una duración aproximada de seis horas y mata habitualmente a la célula hospedadora. 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 α (2,3), mientras que en mamíferos usan enlaces α (2,6) (Ito T, 2000).

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. La **penetración** del virus a la célula susceptible se realiza por endocitosis mediada por receptores. El virus de la influenza es transportado al interior de la célula a través de la vía normal mediada por vesículas recubiertas de clatrina/endosomas. Dentro de la vesícula el pH bajo causa una alteración de la conformación de la espícula HA, lo que conduce a la exposición del extremo amino hidrófobo de la proteína HA2. El ambiente ácido de los endosomas provoca la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática del endosoma, desnudando la nucleocápside y liberando las RNP al citoplasma. El descenso de pH también activa el flujo de protones desde el endosoma al interior de la partícula, mediado por la proteína M2 presente en la membrana viral. La activación de M2 induce la bajada de pH en el interior de la partícula viral y consiguientemente la desestabilización de las interacciones entre las RNPs y la M1 que las recubre (Zhirkov O, 1992).

Las partículas virales que contienen HA que no ha sido clivada se adsorben a las células pero no son internalizadas.

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. 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 (Hay A, 1998).

La biosíntesis de proteínas tardías marca el fin de la acción de las proteínas tempranas. Estas proteínas tardías o estructurales, originan los capsómeros y la cápside. La síntesis de las espículas glicoproteicas se realiza en el retículo endoplasmático liso y en aparato de Golgi, donde se almacenan, para luego dirigirse a la cara interna de la membrana plasmática. Serán incorporadas al virus durante la liberación por gemación.

El ensamble, es la siguiente etapa, una vez finalizada la biosíntesis viral, que transcurre en compartimentos celulares diferentes. La localización nuclear de las proteínas M y NS2 es esencial para la migración de las RNP fuera del núcleo para el ensamble de la progenie viral en el citoplasma.

Los viriones adquieren envoltura y sufren maduración a medida que van brotando de la membrana celular del hospedador. La etapa final es la liberación de la progenie viral al exterior celular. Los virus de la influenza brotan de la membrana plasmática de las células infectadas. Durante el brotamiento, la hemaglutinina sufre clivaje proteolítico por las enzimas del huésped. Este proceso es necesario para que las partículas liberadas sean infecciosas. Los viriones recién sintetizados tienen en su superficie glicoproteínas que contienen ácido siálico como parte de su estructura de carbohidratos, y por tanto son vulnerables a auto-aglutinación por la hemaglutinina. La principal función de la neuraminidasa viral es la remoción de esas partículas (Laver y cols, 1999).

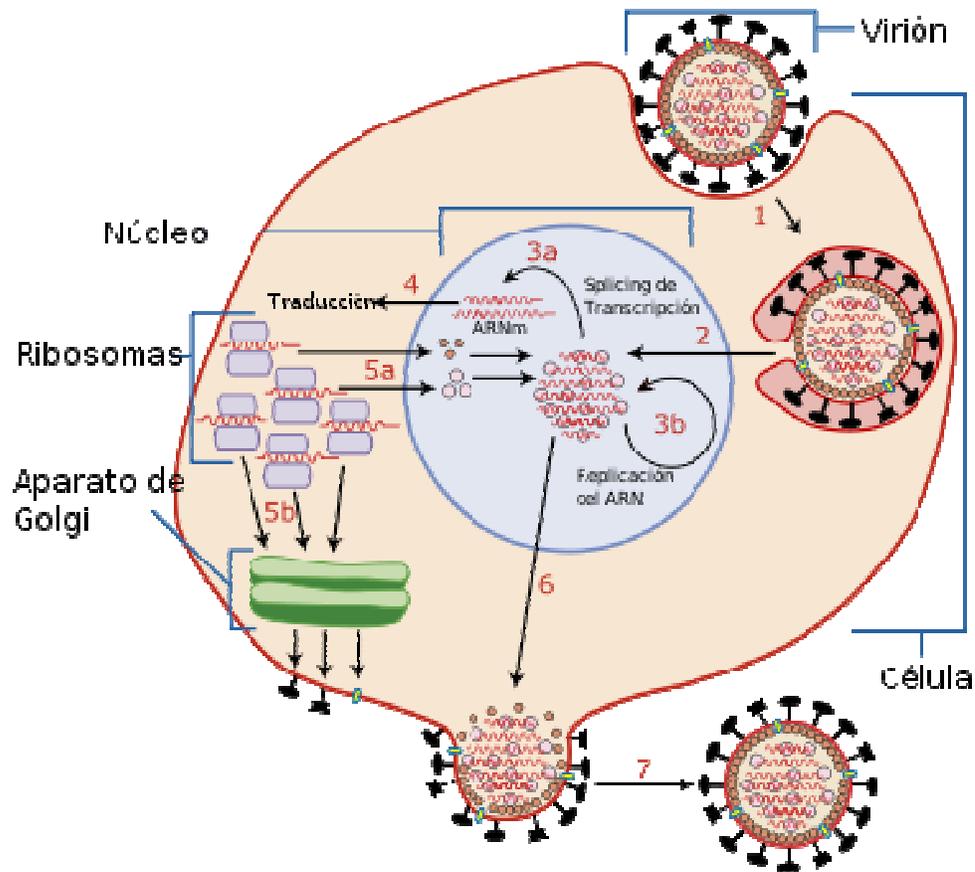


Figura 5. Invasión y replicación del virus de la influenza en una célula hospedera. Los pasos del ciclo son los siguientes: 1- Adsorción, 2- Liberación del material genético y migración al núcleo, 3a y 3b- transcripción del ARN viral, 4- ARNv exportado al citoplasma y traducido, 5b- nuevos virus son secretados a través del aparato de Golgi o son transportados de regreso al núcleo para unirse al ARNv y formar nuevas partículas genómicas virales (5a). 6- El ARNv y las proteínas de la envoltura migran desde el núcleo al citoplasma en donde se ensamblan, 7- Brotamiento y liberación de los nuevos virus. (Extraído y adaptado de Nayak y cols, 2004)

1.7. GENETICA DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA

1.7.1. Reordenamiento

El reordenamiento es una forma de recombinación en donde dos o más virus de la influenza del mismo o diferente subtipo, co-infectan una célula e intercambian segmentos de ARN para formar así un nuevo virus. El reordenamiento de los segmentos del genoma contribuye al aumento de la diversidad de los virus de la influenza y está asociado con epidemias severas y pandemias. Los virus de la influenza A causaron las últimas 4 pandemias más relevantes: 1918, 1957, 1968 y 2009, todas ellas a causa de eventos de reordenamiento inter-subtipo (Garten y cols, 2009).

Eventos de reordenamiento pueden ser detectados cuando secuencias de diferentes segmentos de un mismo virus ocupan posiciones incongruentes en los árboles filogenéticos. Hasta hace poco, eran solamente frecuentes reordenamientos que involucraban la HA y NA, quizás porque la gran mayoría de las secuencias del virus disponibles en el banco de datos eran para HA y NA. Sin embargo las secuencias de otros genes del virus mostraron que puede haber reordenamiento en segmentos internos y entre cepas humanas del mismo subtipo (Holmes, 2005).

La tasa de reordenamiento en los virus de la influenza A también brinda conocimientos en cuanto a la protección cruzada inmunológica, la cual es relevante en el diseño de las vacunas. El reordenamiento entre cepas que pertenecen a diferentes tipos antigénicos necesariamente significaría que ambas co-infectan una única célula, implicando así que la protección no es del todo completa en este nivel de diferencia antigénica. Finalmente el estudio de los modelos de reordenamiento podría brindar importantes claves a la unión de segmentos genómicos, ya que se espera que segmentos estrechamente ligados estén sujetos a menor frecuencia de reordenamiento (Nelson y col, 2007).

El reordenamiento da como resultado diferencias sustanciales en la historia evolutiva de cada gen individual. Sin embargo, similitudes en la historia de algunos genes indicarían que además de las características antigénicas de la HA, el contexto genómico y la compatibilidad de ciertas combinaciones génicas contribuyen a una mejor capacidad replicativa del virus (Rambaut y cols, 2008).

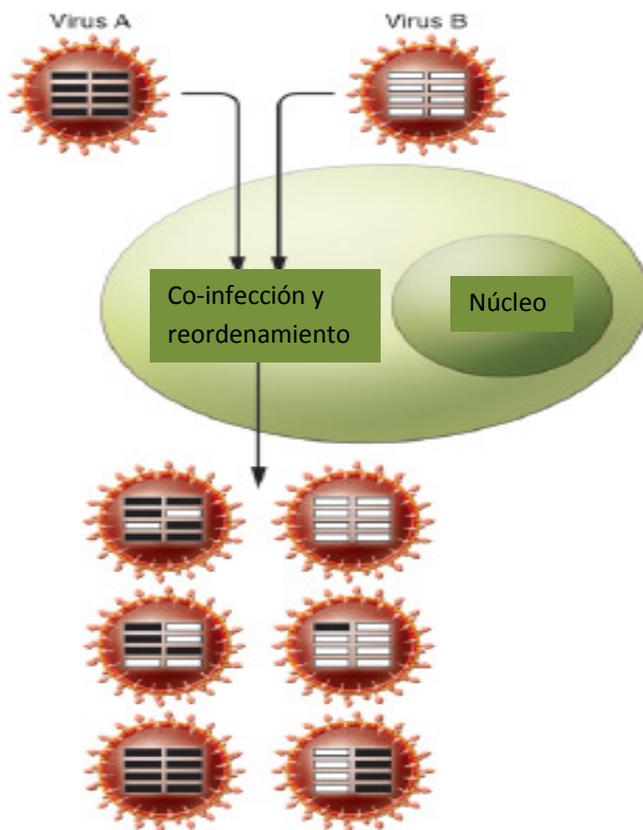


Figura 6. Proceso de reordenamiento de los virus de la influenza A. El reordenamiento ocurre cuando 2 virus (denotados aquí como A y B) coinfectan una célula hospedadora. Cada virus contiene 8 segmentos, mostrados como barras blancas y negras. El reordenamiento entre estos 2 virus produce virus con una gran variedad de combinaciones génicas. (Extraído y adaptado de Holmes, 2009)

1.7.2. Recombinación del ARN viral

Sólo se ha descrito una sola vez la recombinación clásica en dónde un segmento de ARN del virus de la influenza contiene material genético de dos virus parentales distintos y se presume sea una forma extremadamente rara de intercambio de información genética entre virus de la influenza.

La recombinación de ARN es la unión de dos cadenas separadas de ARN que ocurre por mecanismos de cruzamiento o por elección de copia. Históricamente para virus de la

influenza, la recombinación de ARN ha sido usada para nombrar al reordenamiento del ARN. A diferencia de virus de ARN de cadena positiva (*Picornaviridae* y *Coronaviridae*), donde la recombinación ocurre a alta frecuencia, hasta ahora no se ha podido comparar para los virus de la Influenza. Sin embargo se han encontrado ejemplos naturales de recombinación de ARN cuando en el sitio de clivación HA1/HA2 de la hemaglutinina se encontró una inserción de nucleótidos derivada del ARN ribosomal 28S del huésped (Orlich M. y cols., 1990) o nucleótidos derivados del gen NP (Orlich M. y cols., 1994). Presumiblemente, éste es uno de los pocos sitios en el genoma del virus de la influenza donde puede ser tolerada una inserción sin ninguna consecuencia adversa para la viabilidad del virus. Más que una recombinación lo que pudo ocurrir en el ARN es un salto de la polimerasa desde un segmento a otro (Fields S.y col., 1982).

1.7.3. Mutantes termosensibles

Mediante mutagénesis química, se han aislado muchos mutantes termosensibles (ts) para comprender las funciones de las proteínas codificadas por cada segmento de ARN. Aunque algunos de estos mutantes han sido útiles para entender el funcionamiento proteico (por ejemplo mutantes de las proteínas NA y M1), no se han obtenido buenos resultados en el uso de mutantes para NS1 y NS2.

Cuando una célula es infectada con dos virus que tienen funciones defectivas en loci diferentes, puede ocurrir complementación entre virus; la función defectiva en un virus es provista por el virus co-infectante, y viceversa. Así se replican los virus infecciosos reordenados que recibieron el complemento total de ocho genes no defectivos. El primer paso en la reactivación de la multiplicidad y reactivación cruzada es la complementación, la cual va seguida por reordenamientos. La complementación entre virus de la influenza A ha sido evaluada entre mutantes termosensibles bajo condiciones en donde mezclas de infecciones se llevan a cabo a temperaturas restrictivas. Los mutantes ts se arreglan en grupos definidos por la habilidad de dos virus ts de producir virus infeccioso durante la co-infección a la temperatura restrictiva (Lamb R. y col., 1996).

1.7.4. Genética reversa

La genética reversa parte de una proteína que haya sido aislada de una célula y que presente propiedades interesantes. Si el punto de partida es una proteína, se clona el gen que la codifica y se determina su secuencia de nucleótidos. Posteriormente se altera la secuencia bioquímicamente, creando un gen mutante que codifique una versión alterada de la proteína. El gen mutante se transfiere a una célula, en la que puede integrarse a un cromosoma mediante recombinación genética y pasar a formar parte de la dotación permanente del genoma celular. Si el gen se expresa, la célula y todos sus descendientes sintetizarán una proteína alterada (Kaiser K., 1990).

En el comienzo de la era de la tecnología del ADN recombinante, ha sido posible alterar genéticamente virus ADN para su estudio y para el uso de virus ADN como vectores para la expresión de genes foráneos. Para muchos virus ARN con genoma infeccioso y de hebra positiva, ha sido posible transcribir genomas ARN desde ADN clonado y así obtener virus infeccioso. Los virus de hebra negativa (como el virus de la influenza) requieren que el virión de ARN se ensamble con un complejo transcriptasa activa para que se inicie la replicación, y hasta hace poco para el virus de la influenza la inhabilidad para solubilizar y reconstituir el complejo transcriptasa en el ARN desnudo ha evitado la ingeniería genética del genoma.

La genética reversa ha tenido, hasta el momento, distintos usos:

- caracterización de la replicación del virus de la influenza

El hecho de que se hiciera posible aislar el complejo polimerasa activo para el virus de la influenza mediante gradiente de centrifugación, permitió realizar la transcripción *in vitro* de pequeñas moléculas de ARN conteniendo las secuencias terminales 5' y 3' del virus y analizar las señales promotoras.

- desarrollo de vacunas atenuadas

La introducción de cambios aminoacídicos en el sitio de clivación de proteasas en el gen HA del virus aviar tipo H5 altamente letal en Hong Kong en 1997, permitió el desarrollo de una vacuna recombinante.

- uso del virus de la influenza como vector

Los genes de la HA y NA han sido manipulados para expresar genes foráneos. Se insertaron pequeños epítopes en el sitio antigénico del tipo de influenza B de la HA del virus WSN. Los virus recombinantes son altamente antigénicos y pueden ser útiles para el desarrollo de la

vacuna. Por otro lado, la expresión de genes foráneos usando la NA fue relativamente poca. Recientemente se han introducido genes foráneos en el gen de NS1 para poder así expresar la poliproteína usando la propia secuencia proteolítica 2^a entre dos genes. El gen foráneo fue altamente expresado, siendo además sensibles a la temperatura y atenuados en roedores (Enami M., 2002).

1.8. EPIDEMIOLOGIA

1.8.1. Características clínicas y vías de transmisión

La influenza es una infección altamente transmisible que puede diseminarse por aerosoles o por el contacto de persona a persona. El período de incubación de la influenza es de uno a cuatro días, dependiendo en parte a la dosis de virus y al estado inmunitario del hospedador. Las células blanco primarias de los virus son aquellas del epitelio respiratorio desde las vías aéreas superiores hasta los alvéolos. Las células infectadas se desprenden, lo que permite la extravasación del líquido y la inflamación submucosa secundaria.

El síndrome de influenza típico en los niños mayores de 5 años y adultos previamente sanos consiste en la aparición bastante súbita de fiebre $> 38^{\circ}\text{C}$ y traqueobronquitis, con una tos seca que causa malestar subesternal. Los síntomas sistémicos, que incluyen mialgias, cefaleas, dolores generalizados, malestar general y letargo, a menudo son prominentes. La enfermedad puede presentarse como una infección asintomática o en formas leves como rinitis o faringitis. Como complicaciones más graves y a veces fatales, pueden ocurrir neumonías, particularmente en personas mayores con enfermedades crónicas (Glezen y cols, 1982).

La edad es un factor muy importante en las epidemias anuales de gripe. Si bien las tasas de incidencia son mayores en niños pequeños y adolescentes, la mortalidad es mucho más frecuente entre los enfermos de más edad, tengan o no patología subyacente (Glezen y cols, 1982).

1.8.2. Nomenclatura de los virus de la influenza

Los virus de la influenza se denominan taxonómicamente por un acrónimo en el que se incluye en primer lugar el tipo de virus gripal A, B o C, indicándose a continuación el hospedador animal en el que se ha aislado, si la cepa no es de origen humano. Posteriormente se incluye el origen geográfico de la cepa aislada, número de laboratorio de la cepa y año de aislamiento seguido entre paréntesis de la descripción antigénica del subtipo de HA y NA (figura 7).

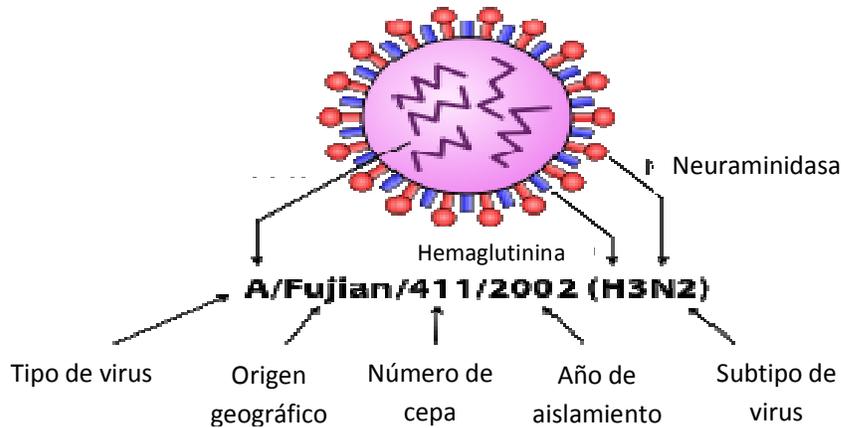


Fig 7. Nomenclatura de los virus de la influenza A.

1.8.3. Variaciones antigénicas

1.8.3.1. Deriva antigénica (variaciones menores)

Las variaciones menores o deriva antigénica afectan sobre todo a la HA y son el resultado de mutaciones puntuales espontáneas en los genes que codifican la HA de un subtipo de virus de la influenza que se traducen en cambios antigénicos y biológicos de dicha glicoproteína. Las variaciones menores suponen la aparición de un virus con una HA suficientemente distinta a la del virus precedente, frente a la cual la población tiene sólo una inmunidad parcial por las exposiciones a cepas anteriores parecidas. La frecuencia con que ocurren espontáneamente estas mutaciones en la naturaleza es difícil de precisar, pero las experiencias de laboratorio sugieren unas tasas de mutación muy altas para el gen HA algo menores para la NA y más bajas para el resto de los genes (Webster y cols, 1982). Cada mutación supone la sustitución de uno o pocos aminoácidos en la secuencia del producto genómico aunque muchas son deletéreas. La velocidad de deriva antigénica es por consiguiente diferente para las distintas proteínas estructurales del virus, siendo rápida y fundamental en la HA y algo menor en la NA, y más lenta y menos trascendente para las consecuencias epidemiológicas en los otros componentes víricos (Okasaki y cols, 1989). Las variaciones menores son la base de las cepas epidémicas del virus de la influenza que ocasionan los brotes epidémicos estacionales y otros brotes más limitados. Sin embargo no puede descartarse que provoquen epidemias

importantes. Aunque la sustitución de pocos nucleótidos en la cadena de ARN al producirse la mutación, supone únicamente la inclusión de pocos aminoácidos equivocados en la secuencia de la HA correspondiente, la estructura secundaria y terciaria de la glicoproteína puede resultar alterada de forma sustancial y sus propiedades antigénicas también.

Las variaciones menores ocurren tanto en el virus de la influenza A, como en el virus Influenza de la B, sin embargo las variaciones menores que se producen en este último suceden con menor frecuencia ya que es mucho más estable que el A. El virus de la influenza B tuvo probablemente su introducción en la especie humana hace mucho más tiempo y está más adaptado que el A (Suzuky y col, 2002).

1.8.3.2. Salto antigénico (variaciones mayores)

Las variaciones mayores o saltos antigénicos implica un cambio total en la matrícula antigénica del virus de la influenza afectando a la HA, a la NA o a ambas que se traduce en la aparición de un subtipo distinto al que circulaba.

Las pandemias por influenza ocurren generalmente como consecuencia de la aparición o emergencia de un nuevo subtipo del virus influenza A.

Los mecanismos epidemiológicos y biológicos postulados en la aparición de las variantes mayores son: la recombinación o reordenamiento genético de los genes que codifican las glicoproteínas superficiales, la transmisión interespecie directa y la reaparición de un subtipo previo circulante, desde un reservorio no conocido.

El mecanismo más importante de los citados para la génesis de variantes mayores de virus de la influenza está constituido por los mecanismos de reordenamiento genético entre los genes de la HA y los de la NA. Los nuevos subtipos del virus de la influenza A aparecen por reordenamiento o reagrupación genético entre cepas diferentes. Las cepas parentales pueden proceder de cualquiera de los múltiples hospedadores, mamíferos o aves que son susceptibles a estos virus.

Los ocho segmentos genómicos de los virus de la influenza A pueden intercambiarse aleatoriamente cuando una célula sufre una infección doble. Por consiguiente hay 256 posibles combinaciones teóricas aunque no todas son viables en la práctica (Scholtissek, 1978).

En la presentación y difusión de nuevos subtipos de virus de la influenza A, puede intervenir un segundo mecanismo, la reaparición de un nuevo subtipo que circuló años atrás en la población humana.

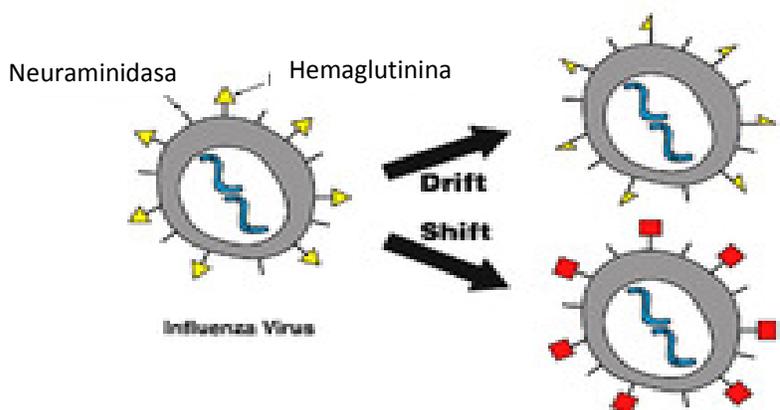


Fig 8. Variación antigénica en los virus de la influenza A. La deriva antigénica (Drift) crea virus con antígenos levemente modificados mientras que el salto antigénico (Shift) crea virus con antígenos nuevos.

1.8.4. Ecología de los virus de la influenza A

Una de las características más importantes en la epidemiología de los virus de la influenza A es su capacidad de producir epidemias anuales y, raramente pandemias. Los virus de la influenza A han sido probablemente los últimos en infectar a la especie humana y continúan su proceso de evolución, una de cuyas características es la deriva antigénica y otra la capacidad de producir epidemias o pandemias de notable intensidad.

Los virus de la influenza A están ampliamente difundidos en la naturaleza en diferentes especies de animales entre las que las aves acuáticas adquieren un notable protagonismo dado que constituyen su reservorio natural. (Webster y cols, 1992). En las aves se produce una presión selectiva negativa al contrario que en los hospederos mamíferos. Desde este reservorio el virus puede pasar a mamíferos u otros animales domésticos, incluidas las aves, que actuarían como hospederos intermediarios en los que podrían tener lugar fenómenos de recombinación o reordenamiento genético, a partir de la mezcla de genes originada por una

coinfección de virus distintos. Este paso por los hospederos intermediarios facilita sin duda la adaptación de un virus de origen aviar a los mamíferos. Posiblemente todos los virus de la influenza A detectados en mamíferos tengan relaciones más o menos cercanas con ancestros de origen aviar; sin embargo, sólo un número limitado de éstos ha sido capaz de propagarse y circular de forma estable en ellos. Los virus de la influenza A que produjeron las pandemias se restringieron a tres subtipos de hemaglutinina (H1, H2 y H3) y dos de neuraminidasa (N1 y N2), y en la actualidad los subtipos H3N2 y H1N1 continúan circulando mayoritariamente en el hombre.

La mayoría de las aves acuáticas migratorias se infectan de forma asintomática por el virus de la influenza A, multiplicándose éste en las células de su epitelio intestinal y eliminándose por casi un mes, en las heces en cantidades abundantes (Webster y cols, 2002). Este mecanismo de transmisión oral-fecal es absolutamente distinto a las transmisiones interhumanas de los virus de la influenza. Con frecuencia estas infecciones inaparentes son mixtas, lo que hace posible la aparición de recombinaciones genéticas (Cox y cols, 1995).

La naturaleza no virulenta de la infección por influenza aviar sería el resultado de la adaptación del virus a su hospedero cientos de años, creando así un reservorio que asegura la perpetuación del virus. Esta especulación sugiere que las aves acuáticas ocupan una posición importante y única en la historia natural de los virus de la influenza (Easterday, 1975).

Un reservorio de particular proximidad al ser humano y relacionado con el anterior lo constituyen las aves domésticas. La influenza aviar es una enfermedad generalmente mortal de las mismas con un cuadro respiratorio y nervioso, pero también puede cursar en ellas como una infección asintomática (Liu y cols, 2002). Todo indica que las aves domésticas constituyen un reservorio secundario de un ecosistema mucho más importante en las aves salvajes y su trascendencia de cara a representar un eslabón de salto a la especie humana está bien documentada (Campitelli y cols, 2002).

1.8.5. Transmisión interespecie

La transmisión interespecie de los virus de la influenza A es un hecho comprobado, pero la adaptación al hospedador es un escalón decisivo para continuar la difusión intraespecie de los virus que hacen el salto de especie. Este salto precisa en ocasiones ciertos “peajes biológicos”. Así el receptor de la HA de virus humanos tiene una afinidad preferente para los receptores de ácido siálico de la mucosa respiratoria a través de un enlace α 2,6. Este receptor no lo poseen las aves, las cepas de virus de origen aviar poseen hemaglutininas con tropismo para receptores de ácido siálico con enlaces α 2,3 que no está presente en el epitelio respiratorio humano. Cada virus utiliza un receptor específico para aves y humanos, según su linaje humano o aviar. Sin embargo ambos receptores coexisten en la tráquea del cerdo, con lo cual este animal puede albergar con más facilidad infecciones producidas por virus de origen humano (receptor α 2,6) y de origen aviar (receptores α 2,3), de esta manera podemos explicar la dificultad de salto interespecie que puede modificarse cuando se modifican propiedades biológicas de las hemaglutininas víricas o aparecen hospederos susceptibles (Ito y cols, 1998).

La presencia de virus de la influenza en cerdos fue primeramente observada durante la pandemia de 1918. Los signos de enfermedad en cerdos, así como en humanos, están caracterizados por descarga nasal, tos, fiebre, conjuntivitis y dificultad para respirar (Shope, 1931). El aislamiento de virus de la influenza en cerdos (A/Swine/Iowa/15/30) y análisis serológicos retrospectivos en humanos indicó que los virus de origen porcino eran antigénicamente similares a la influenza A responsable de la pandemia de 1918 en la población (Smith y col, 1989). Desde entonces, los virus de la influenza permanecen en la población de cerdos, circulando todo el año y siendo el responsable de la prevalencia de enfermedad respiratoria en cerdos en Norteamérica.

1.8.6. Transmisiones transitorias de virus influenza aviar a humanos desde 1997

H5N1

El virus de la influenza A de origen aviar H5N1 que infectó a humanos en 1997 adquirió los ocho segmentos de aves de Eurasia y retuvo la preferencia por unión a receptores α 2,3, una característica típica de los virus influenza de origen aviar (Matrosovich y cols, 1999). El brote por H5N1 en 1997 fue exitosamente erradicado al matar a todas las aves domésticas de Hong Kong. Sin embargo, el gen HA de la cepa de H5N1 de 1997 continuó circulando en el sureste de China, y fue rápidamente reemplazado por diferentes genotipos (Guan y cols, 2002) que fueron altamente patogénicos en pollos pero no en patos. Estos virus H5N1 fueron nuevamente erradicados con la matanza de todos los pollos. De 1997 a 2001, la HA de los genotipos circulantes de H5N1 permanecieron antigénicamente homogéneos, pero en 2002 surgió una marcada deriva antigénica (Guan y cols, 2004). La propiedad más remarcable del genotipo H5N1 que circulaba en 2002 fue su alta patogenicidad en aves acuáticas, una propiedad raramente encontrada en la naturaleza. La magnitud sin precedentes de influenza aviar surgida en los países asiáticos en 2004, con H5N1 en China, Japón, Corea del Sur, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Camboya y Laos; H7N3 en Pakistán; y H5N2 en Taiwán hicieron como resultado, la destrucción de millones de aves domésticas, principalmente pollos. En la mayoría de los países, los brotes de H5N1 de origen aviar altamente letales se confinaron en las aves, pero al menos en dos países el virus fue transmitido a humanos y la mayoría de los infectados murieron.

Muchas oportunidades para el éxito de la transmisión de H5N1 a humanos son provistas por la continua evolución del virus en Asia, su facilidad para reordenarse, la generación de múltiples genotipos de virus H5N1, deriva antigénica en la HA de los virus H5N1, y la adquisición de alta patogenicidad de aves acuáticas. Si ocurre la oportunidad de reordenamiento con cepas humanas, entonces la probabilidad de éxito en la transmisión entre humanos es alta.

H9N2

En 1999, un virus de la influenza A de origen aviar subtipo H9N2 fue transmitido a dos niños en Hong Kong (Lin y cols, 2000). El brote se esparció en China. Estos incidentes fueron causados por virus H9N2 antigénicamente diferentes. Los virus H9N2 adquirieron preferencia por unión a receptores α 2,6 y fueron detectados en cerdos en Hong Kong (Peiris y cols, 2001). Los virus H9N2 son ahora endémicos en aves domésticas en Eurasia; su presencia en estos animales representa su amplia variedad de hospederos desde los años 1980.

H7N7 y H7N2

La transmisión de virus de la influenza A subtipo H7N7 en aves en Holanda en 2003 causó severas pérdidas de aves domésticas (Koopmans y cols, 2003). El virus también fue transmitido a humanos. Hubo evidencia de transmisión limitada humano-humano así como transmisión a cerdos.

Desde 1994, virus de la influenza A subtipo H7N2 han circulado en mercados de aves en Nueva York (Suarez y cols, 2003). Aislados en 1994 de virus H7N2 mostraron dos aminoácidos básicos en el sitio de clivaje de la HA. Posteriormente en el tiempo el virus adquirió otros dos aminoácidos básicos mas y se esparció a granjas de aves (Suarez y cols, 2003). A pesar de que se caracterizaron como virus de baja patogenicidad, la industria de las aves en Estados Unidos eliminó el virus de las granjas.

1.8.7. Estacionalidad de los virus de la influenza

El virus de la influenza posee unas características de estacionalidad muy marcada entre las estaciones frías y cálidas en los países con diferencias climáticas importantes (Kilbourne, 1987). Esta estacionalidad aparece de igual forma en el hemisferio norte y sur.

La enfermedad alcanza sus picos de mayor prevalencia durante el invierno, y debido a que el hemisferio norte y el hemisferio sur atraviesan esta estación en diferentes momentos existen,

de hecho, dos temporadas de gripe cada año: de octubre a abril en el hemisferio norte y de mayo a septiembre en el hemisferio sur. Este es el motivo por el que la OMS (asesorada por los Centros Nacionales para la Gripe) hace recomendaciones para dos formulaciones vacunales cada año: una para cada hemisferio (OMS, 2006). Además del clima y la humedad, el estilo de vida de las poblaciones y otros factores están asociados a la aparición de la gripe (Gutierrez y cols, 2001).

No está completamente claro por qué las epidemias de gripe ocurren de esta forma estacional y no de manera más uniforme a lo largo de todo el año. Una posible explicación es que el contacto interpersonal es más estrecho en invierno debido a un mayor tiempo de vida en el interior de domicilios y edificios, y esto facilitaría una transmisión del virus de persona a persona. Otra explicación es que las temperaturas más altas de los meses de verano y la mayor sequedad del aire limitaría la expulsión del moco por deshidratación del mismo, dificultando la transmisión a través del mecanismo de aerosol que se da durante la tos o el estornudo. El virus también puede sobrevivir mucho más tiempo en los fomites (objetos y superficies transmisores como pomos de puertas, mesadas) cuando el ambiente es más frío. Los factores ambientales también pueden ser un punto clave en la transmisibilidad del virus. Los virus sobreviven más fácilmente en los aerosoles producidos en condiciones de baja temperatura (por debajo de 5 °C) y baja humedad, que son las predominantes en los países de estacionalidad marcada (Lowen y cols, 2007), la ventilación reducida, hacinamiento y escolaridad. Los cambios estacionales en las tasas de contacto durante los períodos escolares parecen jugar un rol más importante que en otras enfermedades escolares como el sarampión y la tos ferina. Una combinación de estos pequeños factores estacionales puede verse amplificada por fenómenos de resonancia dinámica con los ciclos endógenos de enfermedades regionales (Dushoff y cols, 2004). También se ha propuesto que la deficiencia de vitamina D durante los meses de invierno reduciría la efectividad del sistema inmune y entonces podría favorecer la estacionalidad del virus (Cannell y col, 2006). Todos estos factores tienden a converger en los períodos invernales y por ello han sido propuestos como determinantes sin una explicación definitiva (Tacker y cols, 1986).

Sin embargo, los cambios estacionales en las tasas de infección se dan también en regiones tropicales y estos picos de infección pueden verse principalmente durante la temporada de lluvias (Shek y col, 2003).

La estacionalidad en zonas de clima tropical y subtropical no es tan marcada, existiendo casos de gripe a lo largo de todo el año. Históricamente el sudeste de Asia, debido a la proximidad con como los humanos viven con sus animales domésticos (Webster y cols, 1992), ha sido considerado una zona ideal para la generación de cepas pandémicas (figura 9). Con un nivel bajo y constante de circulación de los virus de la influenza durante todo el año, el sudeste de Asia es considerado el epicentro ideal para la generación de nuevas cepas que luego se transmitan al resto del mundo (Viboud y cols, 2006; Rambaut y cols, 2008).

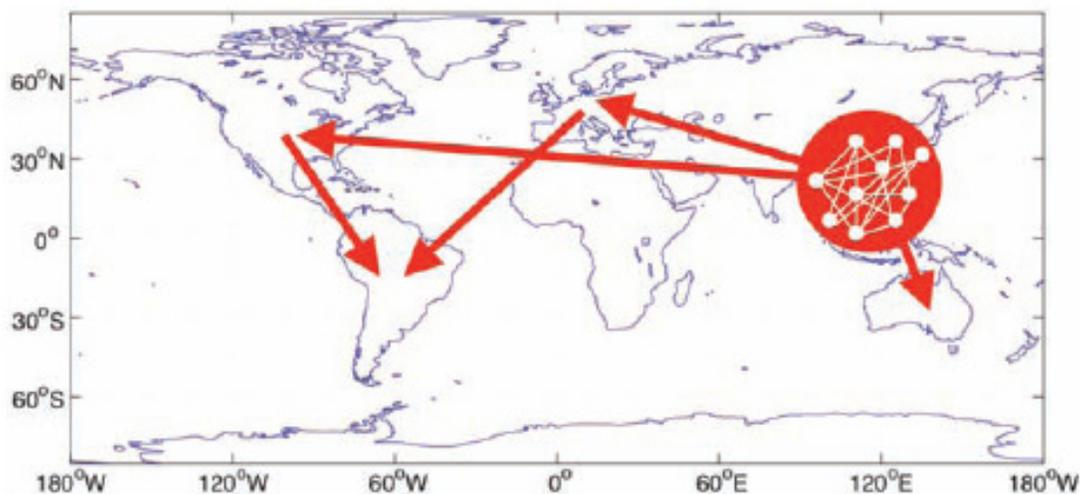


Figura 9. Migración global de los virus de la influenza A. Las epidemias estacionales del virus comenzarían a circular en el este y sudeste de Asia antes de migrar a otras regiones del mundo (las flechas indican la dirección de la migración). Las nuevas cepas del virus se exportan a Australia, Europa y Norteamérica para finalmente llegar a América del Sur. (Extraído y adaptado de Russell y cols, 2008).

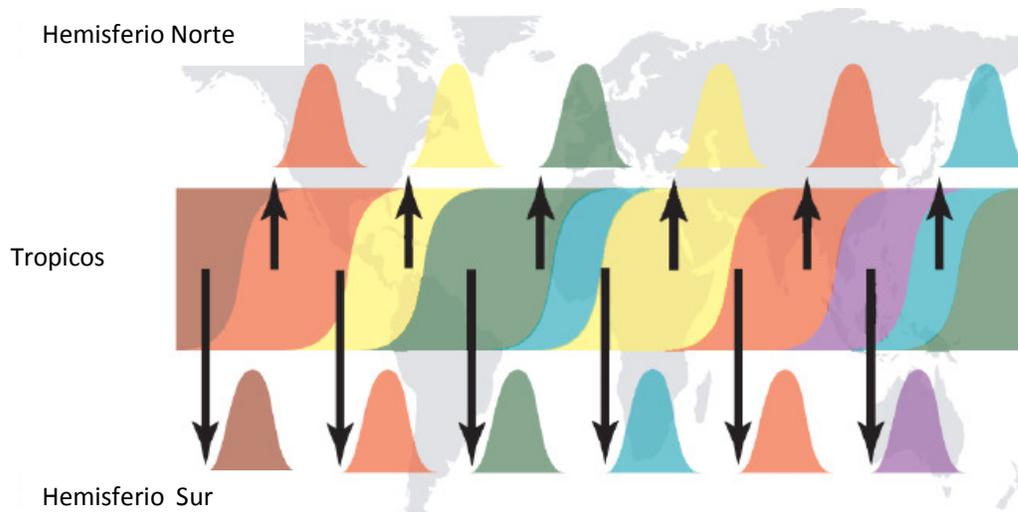


Figura 10. Modelo de evolución de los virus de la influenza A. La diversidad genética y antigénica (mostrada con diferentes colores) es continuamente generada en un reservorio, quizá representada por los trópicos, antes de migrar hacia el hemisferio norte y sur como se muestra con flechas. (Extraído y adaptado de Rambaut y cols, 2008).

1.8.8. Epidemias

Los virus de la influenza A causan epidemias anuales relacionadas a la disminuída inmunidad a los sitios antigénicos en la superficie de las glicoproteínas HA y NA a causa de la deriva antigénica, e infrecuentes pandemias seguido de salto antigénico. Nuevas variantes desplazan a las más viejas de manera anual y con un rango constante (Rota y cols, 1992; Yamashita y cols, 1988).

Las epidemias de los virus de la influenza en humanos son causadas por la rápida evolución del genoma viral y la emergencia de variantes antigénicas juega un rol importante en la morbi-mortalidad por infecciones del tracto respiratorio.

En una epidemia típica (Glezen P., 1978):

- al inicio, aumenta el número de niños que padecen fiebre
- los casos alcanzan un pico máximo en las siguientes 2-3 semanas
- cifras crecientes de adultos se quejan de síntomas compatibles con gripe
- el absentismo escolar y laboral llega al máximo durante este periodo

- existe un incremento en las admisiones hospitalarias de pacientes con neumonía, exacerbaciones de enfermedades pulmonares crónicas y problemas cardíacos
- subsecuentemente ocurre un incremento de muertes por estos padecimientos.

Las epidemias ocurren prácticamente cada año, pero varían en intensidad, típicamente durante los meses más fríos del año en las zonas de clima templado, causando considerable morbilidad en todos los grupos etarios.

Surgen por una combinación de la deriva antigénica que ocurre de temporada en temporada y una disminución de la inmunidad entre la población y tienden a seguir un patrón característico.

La epidemiología de los virus de la influenza A y B parece ocurrir de manera paralela al comportamiento evolutivo.

Los virus de la influenza A son generalmente más virulentos que los tipos B y C (Yamashita y cols, 1988). Sin embargo, estudios recientes han demostrado un impacto clínico substancial atribuible a los virus de la influenza B los cuales demostraron causar síntomas respiratorios severos así como enfermedades del sistema nervioso central (Chan y cols, 1999; Fujimoto y col, 1998).

La dinámica de las epidemias por virus de la influenza tiene grandes variaciones a lo largo del año, y las epidemias que son dominadas por los virus A/H3N2 se han asociado con alta transmisión de la enfermedad y una más rápida dispersión respecto a las temporadas invernales dominadas por el subtipo A/H1N1.

1.8.9. Pandemias

Las pandemias por el virus de la influenza, es decir brotes que se esparcen por todo el mundo, surgen como consecuencia de un salto antigénico.

- * ocurren a intervalos impredecibles
- * se desarrollan cuando un nuevo subtipo de virus A aparece y ante el cual la población mundial posee poca inmunidad o ninguna.

- * son generalmente peores cuando existen cambios significativos en los 2 principales antígenos de superficie del virus de la influenza A.

Durante los últimos 300 años las pandemias han tendido a ocurrir cada una o dos décadas aunque la frecuencia ha sido bastante variable (Patterson K., 1986; Beveridge W., 1991). Muchos de estos brotes parecen haber comenzado en Asia, más probablemente en China (Patterson K, 1986; Shortridge K y col., 1982).

Tabla 2. Pandemias por virus de la influenza A.

Año	Subtipo	Muertes (x10⁶)	País de origen
1889	H2N2	6	Europa
1898	H3N2	0.5	Europa
1918	H1N1	40	Europa
1957	H2N2	4	Asia
1968	H3N2	2	Asia
1977	H1N1	sd	Asia (laboratorio)
2009	H1N1	< 0.1	Norteamérica

sd significa sin dato

Pandemia 1918-1920

La pandemia de 1918 ha pasado a la historia por su excepcional virulencia. Alrededor de un tercio de la población mundial fue infectada en 1918-1919 (Frost, 1920). Fue de gran severidad para adultos jóvenes y sanos de entre 15 a 35 años, entre los que se registraron las mayores tasas de mortalidad (entre el 2.5 y 5 %, más de cincuenta veces la mortalidad producida por otras epidemias de gripe) (Reid y cols, 2001). Más de 40 millones de muertes ocurrieron durante esta pandemia (Johnson y cols, 2002).

La pandemia de 1918 produjo tres olas epidémicas: Una inicial, más benigna, transcurrió durante la primavera de 1918, seguida de dos olas de mayor letalidad en el otoño e invierno de 1918 y 1919 respectivamente. El brote al parecer se originó en cuarteles militares estadounidenses y cruzó Europa y Norteamérica y alcanzó lugares remotos (tierras vírgenes de Alaska y las islas del Pacífico). Aún no se habían descubierto los antibióticos. En su mayoría, la gente que murió durante la pandemia lo hizo por neumonía causada por bacterias oportunistas que infectaron a quienes la gripe ya había debilitado.

Los estudios seroarqueológicos y de epidemiología molecular sugerían que el virus responsable de la Influenza estaba estrechamente relacionado con el virus H1N1 de la gripe porcina clásica. Análisis de regresión de secuencias virales de humanos y cerdos obtenidas de 1930 al presente ubican al precursor del virus de 1918 circulando en humanos entre 1915-1918 (Taubenberger y cols, 2000). La comparación con las secuencias disponibles de cerdos, seres humanos y aves, emplazó a las cepas del virus de 1918 cerca de la raíz del linaje mamífero. El análisis de la HA mostró que el virus más relacionado fue A/swine/Iowa/30, el primer aislado de Influenza porcina del que se dispone secuencia (Shope, 1936). Esta semejanza se debe al hecho de que los virus en el hombre evolucionan más rápidamente por estar sometidos a mayor presión inmune como corresponde a su vida más larga. No obstante, la secuencia de la hemaglutinina presentó muchas de las características de las hemaglutininas aviarias. Treinta y siete de los 41 aminoácidos sometidos a presión inmune coincidieron con la secuencia consenso aviar y el virus de 1918 conservó los cuatro sitios de glicosilación aviarias, un mecanismo que emplean los virus de la influenza para evadir la respuesta inmune (Reid y cols, 1999).

La capacidad del virus 1918 para producir una grave alteración del tracto respiratorio, superior o inferior, induce a pensar que se replicaba con suma celeridad y pasaba presto de célula a célula. Se sabe que la proteína viral NS1 impide la síntesis del interferón (IFN) tipo I, un sistema de "alerta precoz" que las células utilizan para desplegar la respuesta inmunitaria contra la infección del virus. Análisis de virus recombinantes crecidos en cultivos de células de tejido pulmonar humano, mostraron que el virus portador del gen NS1 de 1918 bloqueaba con eficacia realizada el sistema IFN tipo I del huésped (Basler y cols, 2001).

Pandemia 1957-58

En febrero de 1957 apareció bruscamente en el sureste de China un nuevo virus influenza que por el origen de la pandemia se llamo ‘gripe asiática’. El nuevo virus no tenía relación antigénica con los virus precedentes y correspondió al subtipo H2N2. El mayor desarrollo de los medios de transporte marítimo y terrestre en comparación con pandemias precedentes permitió su extensión más rápida. En un plazo de diez meses la pandemia dio la vuelta al mundo. Una primera ola epidémica estuvo asociada a extensa morbilidad e incrementos bruscos de la mortalidad. Una segunda ola de igual o mayor severidad siguió en enero 1958. Las tasas de ataque más altas con porcentajes superiores al 50% se dieron en niños pequeños y ancianos (Glezen y cols, 1996). Sin embargo, el virus no se consideró excesivamente virulento, y la mortalidad se atribuyó en gran parte a la falta de inmunidad de la población.

El estudio genético retrospectivo mostró que el virus había adquirido los segmentos HA, NA y PB1 de un virus Influenza aviar y mantuvo el resto del virus H1N1 pre pandémico (Kawaoka y cols, 1989).

Pandemia 1968-70

El virus de la gripe asiática circuló hasta 1968 cuando fue reemplazado por el virus de la gripe Hong Kong. La nueva pandemia se originó de nuevo en China. En una primera fase, la pandemia se extendió a los países vecinos. En Norteamérica la epidemia empezó en la costa este, coincidiendo con el retorno de las tropas de Vietnam. En Europa su difusión fue más lenta.

La pandemia fue considerada en general poco severa. Como en 1957, la población susceptible fue niños pequeños y ancianos. En 1968 la mortalidad debida a la gripe fue aproximadamente de la mitad que la producida durante el primer año de prevalencia de la gripe asiática. La inmunidad previa de la población conferida por la NA compartida entre ambas cepas moderó la severidad de la pandemia (Cox y cols, 2000).

El virus Hong Kong fue del subtipo H3N2 y también emergió por un mecanismo de redistribución de los fragmentos genómicos. El virus híbrido adquirió los genes HA y la PB1

posiblemente de un reservorio aviar y mantuvo el resto de los segmentos genómicos del virus pre pandémico (Stuart-Harris y cols, 1985)

Pandemia 1977-78

En mayo de 1977 se aisló un nuevo virus de la influenza en China esparciéndose rápidamente a Rusia y 7-9 meses después la pandemia se extendió por Europa, Norteamérica y Australia. El virus fue caracterizado como subtipo H1N1.

Hay una serie de precepciones que sugieren que la pandemia no tuvo un origen natural. El virus fue antigénica y genéticamente casi idéntico a los virus H1N1 que circularon a comienzos de la década de los 50 (Nakajima y cols, 1978; Scholtissek y cols, 1978). La morbilidad se concentró en niños y adultos jóvenes que carecían de inmunidad frente al subtipo H1N1 y el exceso de mortalidad no fue tan aparente como en el de las pandemias previas. La similitud con los virus de los años 50 apuntan a que el virus permaneció congelado en alguna localización natural o artificial, ya que es muy improbable que el virus se mantuviera en un hospedador animal sin posterior evolución.

Otra de las características de esta pandemia fue que el virus de la gripe de 1977 no desplazó el virus pre pandémico (H3N2). Ambos virus continuaron circulando en la población humana. El reordenamiento entre ambos virus H1N1 y H3N2 resultó en la aparición de virus H1N2 en humanos en el año 2001. Sin embargo, estos virus H1N2 no circularon durante mucho tiempo.

Pandemia 2009

En Abril 2009, brotes debido a una nueva cepa de virus de la influenza A/H1N1 pandémica, H1N1pdm, fue reportada desde México y Estados Unidos rápidamente esparciéndose para la región sudamericana en donde se detectaron los primeros casos en Mayo de 2009. El 11 de

junio 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara alerta por pandemia en fase 6. Para Marzo 2010, la mayoría de los países tenían casos reportados, con más de 17.700 muertes entre los casos confirmados por laboratorio reportados a la OMS (WHO, 2010).

Análisis del genoma de la nueva cepa pandémica H1N1pdm, indicaron que la nueva cepa que estaba circulando en humanos era un virus estrechamente relacionado a los virus de la influenza A que circulan en cerdos en Norteamérica, Europa y Asia (Trifonov y cols, 2009).

Los segmentos que codifican al complejo polimerasa, HA, NP y NS muestran un gran parecido con los virus de la influenza A H1N2 aislados de cerdos a fines de 1990 en Norteamérica. Las cepas H1N2 y otros subtipos son descendientes de virus H3 de cerdos con triple reordenamiento aislados en Norteamérica. Estos virus reordenados se han dispersado en cerdos por todo el mundo y se ha demostrado que infectan al ser humano (Shinde y cols, 2009). Los segmentos que codifican para los genes NA y M de los nuevos virus H1N1 en humanos están relacionados con cerdos de Europa que circulaban a principios de 1990.

La infección por virus de la influenza fue identificada como causa de enfermedad febril respiratoria en cerdos en 1931, tres años antes que los virus de la influenza fueran identificados en humanos (Shope, 1931). Los virus de la influenza clásicos en cerdos son epidémicos entre cerdos de Norteamérica. Desde 1970 se han reportado casos de infecciones por virus de la influenza de cerdos en humanos (Hinshaw y cols, 1978). A nivel mundial, más de 50 casos de infección por virus de la influenza de cerdos que han sido reportados en humanos, la mayor parte por influenza clásica de cerdos, se han documentado por más de 35 años (Gray y cols, 2007).

En 1998, un nuevo virus H3N2 triple reordenado (que contenía genes de H1N1 porcino clásico, virus influenza aviar de Norteamérica y H3N2 estacional de origen humano), fue reportado como la causa de los brotes por virus de la influenza en cerdos de Norteamérica, con el subsecuente establecimiento de estas cepas en los cerdos (Webby y cols, 2000). Casi al mismo tiempo, este último virus se reordenó con el virus predominante en ese momento en cerdos, H1N1 clásico, generando entonces el virus H1N2 porcino norteamericano que por otro evento de reordenamiento con un virus porcino de Eurasia genera la nueva cepa pandémica de influenza A/H1N1 en humanos (figura 11). Fue así como se determinó que el nuevo virus pandémico H1N1pdm posee los genes PB2 y PA de virus de origen aviar de Norteamérica, PB1 de virus H3N2 de humanos y HA, NP NS, NA y M de virus de origen porcino de Eurasia (Smith y cols, 2009; Trifonov y cols, 2009).

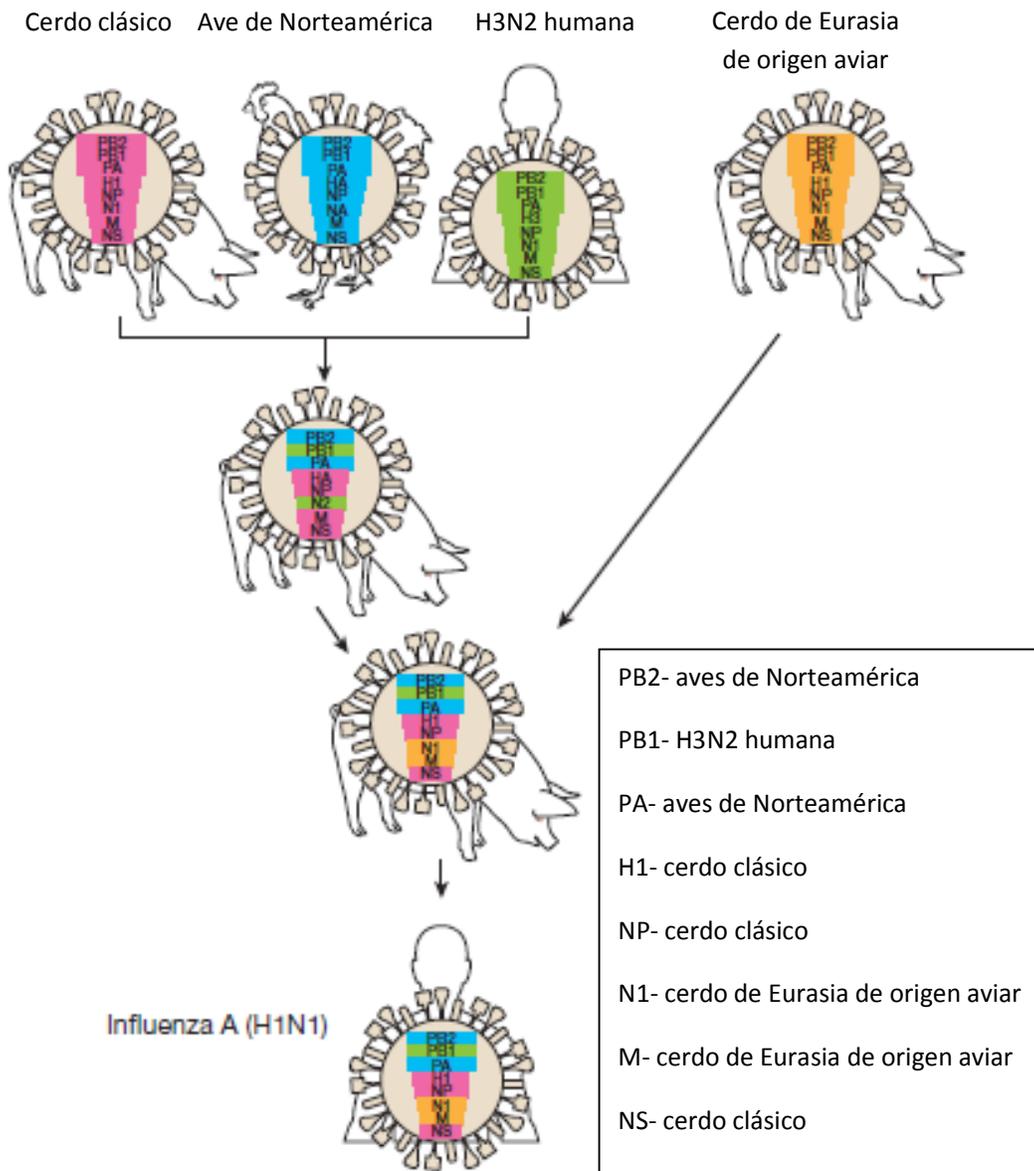


Figura 11. Generación de los virus A/H1N1pdm causantes de la pandemia 2009. A fines de 1990, ocurrieron eventos de reordenamiento entre cepas humanas A/H3N2, cepas aviarias de Norteamérica y cepas de cerdos clásicas resultando así en una nueva cepa triple reasortante que circuló desde entonces en poblaciones de cerdos en Norteamérica. Uno de estos virus triple reasortante se reordenó con un virus de cerdos de Eurasia, resultando así la nueva cepa pandémica de origen porcino que ahora circula en humanos. (Extraído y adaptado de Neumann y cols, 2009).

La nueva cepa H1N1pdm se caracterizó por ser una enfermedad respiratoria febril autolimitada, con signos y síntomas similares a los de la influenza estacional como fiebre (94%), tos (92%) y dolor de garganta (66%). Otros síntomas no típicos de una influenza estacional que se manifestaron fueron vómitos (25%) y diarrea (25%).

La población más afectada fueron los niños y adultos jóvenes y aproximadamente el 90% de los casos fatales ocurrieron en menores a 65 años. Las tasas de hospitalización fueron mayores para niños menores a 5 años (WHOa, 2009), especialmente en menores a 1 año, y las tasa más bajas fueron para personas mayores a 65 años (Louie y cols, 2009). La obesidad severa o mórbida, diabetes, enfermedades cardiovasculares y posibles efectos inmunológicos adversos fueron los que contribuyeron a los casos fatales por H1N1pdm. Los hallazgos radiológicos más comunes incluyen los infiltrados difusos intersticiales y alveolares y en pacientes con co-infección bacteriana también se observó distribución multilobular.

Los métodos de laboratorios más adecuados para la detección del ARN viral de los virus H1N1pdm son la reacción en cadena de la polimerasa convencional o en tiempo real (rRT-PCR) (WHOb, 2009). La muestra ideal es el aspirado nasofaríngeo o el hisopado nasal. Los ensayos comerciales de detección rápida de antígenos tienen poca sensibilidad (11 a 70%) para la detección de los virus H1N1pdm en muestras respiratorias y no pueden diferenciar entre subtipos de influenza A. Consecuentemente, un resultado negativo en los ensayos no debe ser usados para la toma de decisiones para un tratamiento con antivirales. Los ensayos de inmunofluorescencia directa o indirecta son menos sensibles que la rRT-PCR (Blyth y cols, 2009).

Los virus H1N1pdm son susceptibles a los inhibidores de la neuraminidasa oseltamivir y zanamivir pero son resistentes a la amantadina y rimantadina (Itoh y cols, 2009). Cepas resistentes al oseltamivir fueron aisladas de pacientes tratados con oseltamivir, particularmente en aquellos que fueron sometidos a terapias prolongadas con el antiviral o en aquellos donde la quimioprofilaxis post-exposición al oseltamivir ha fallado (WHO, 2010).

Una gran cantidad de información sobre la historia natural y el manejo clínico de la infección por virus H1N1pdm se ha obtenido en un lapso breve de tiempo, pero aún quedan cosas por conocer. La evolución incierta de este virus entre humanos y potencialmente entre otras especies remarca la necesidad de una continua vigilancia virológica para así detectar de manera temprana cambios antigénicos, reordenamiento, resistencia a antivirales y virulencia alterada. Para ello, son necesarios mejoras en la capacidad global para la detección de los

virus de la influenza por análisis moleculares, tales como el ensayo de rRT-PCR, y por aislamiento viral.

1.8.10. Impacto sanitario de la gripe

La importancia de la gripe como problema de salud pública reside tanto en la elevada morbilidad que origina en las poblaciones, provocando que un importante volumen de personas se vean afectadas por esta enfermedad en cortos períodos de tiempo, como en la mortalidad que puede ocasionar, tanto de forma directa como por agravamiento de otras enfermedades de base, sobre todo de naturaleza crónica cardio respiratoria en los grupos denominados de riesgo. A nivel mundial se estima la muerte de 250.000 a 500.000 personas al año. La mayor parte de la morbi-mortalidad causada por los virus Influenza puede ser evitada por la vacunación anual; sin embargo, dicha medida no está asociada con una completa protección en parte debido a la continua evolución de la estructura antigénica del virus.

La gripe es una enfermedad que tiene también notables consecuencias para la actividad económica de los países. Ello obedece sobre todo al importante absentismo laboral y escolar que produce, al que se añaden los costos derivados de la asistencia a los enfermos. El número de hospitalizaciones anuales relacionadas al virus de la influenza supera muchas veces al número de muertes por esta enfermedad. Todo ello puede llegar a alterar de forma notable la capacidad productiva y económica de una sociedad.

1.9. EVOLUCION DE LOS VIRUS INFLUENZA A

Los virus en general tratan de evadir la respuesta del hospedero para asegurar su perpetuación durante años en las especies que son capaces de infectar.

Los virus de la influenza A son de los virus más estudiados debido a la importancia que tiene como patógeno humano (Nelson y col, 2007). El entendimiento de la dinámica evolutiva de los virus de la influenza A es de gran importancia para su control y vigilancia. Otros procesos, junto a la deriva antigénica, juegan roles importantes en la evolución viral: co-circulación de cepas genéticamente diferentes, frecuentes eventos de reordenamiento intra-subtipo y periódicos “barridos selectivos del genoma” ocasionados por la selección natural (Holmes y cols, 2005; Nelson y cols, 2006; Memoli y cols, 2009). La deriva antigénica parece ser un proceso más esporádico de lo que se pensaba, lo que lleva a la pregunta de cuándo ocurre deriva antigénica: quizás durante “cuellos de botella” que ocurren a nivel local en la población, principalmente coincidiendo con los saltos antigénicos, o solamente ocurren bajo ciertas condiciones epidemiológicas en particular (Nelson y cols, 2006) (figura 12).

La evolución de estos virus también está caracterizada por altas tasas de sustituciones amoninoacídicas en las proteínas HA y NA. Esas altas tasas de evolución reflejan la pobre fidelidad de la polimerasa viral (Duffy y cols, 2008), y la fuerte presión de selección para evadir la respuesta inmune del hospedador (Smith y cols, 2004) y, más recientemente el desarrollo de resistencia a los antivirales (Bloom y cols, 2010).

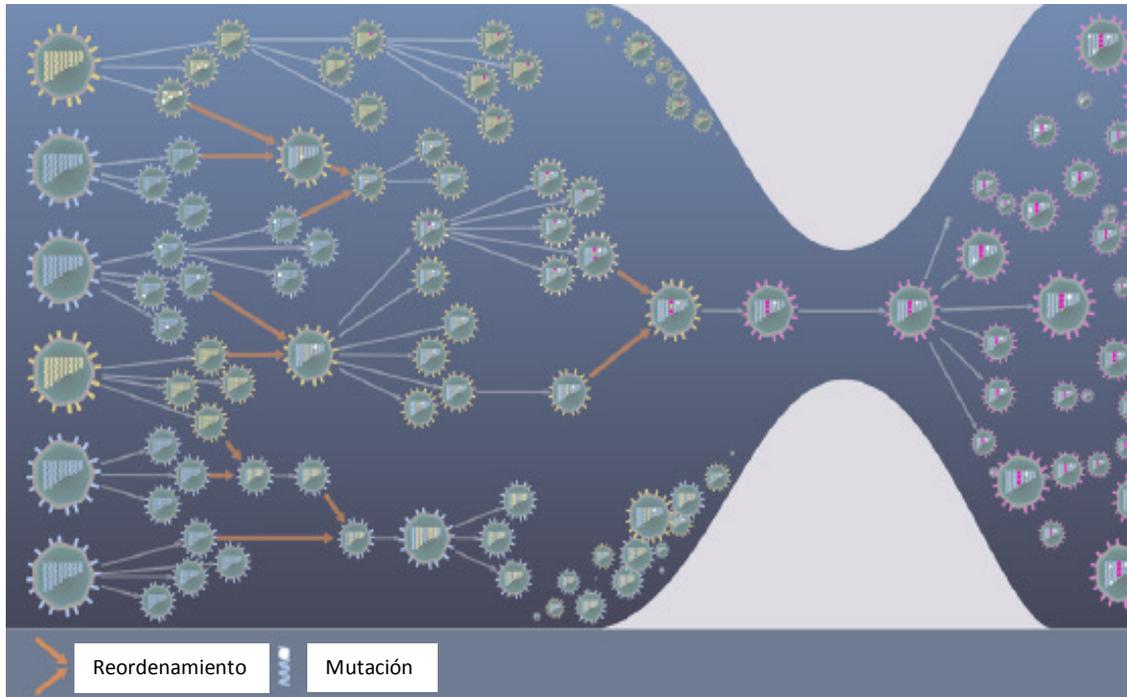


Figura 12. Generación de diversidad genética y deriva antigénica en la evolución de los virus de la influenza A. Los virus amarillos y azules representan 2 cepas antigénicamente similares del mismo subtipo que circulan en la población humana. La diversidad genética de las poblaciones circulantes aumenta por mutaciones y reordenamientos. Las flechas blancas indican la relación el virus ancestral y sus descendientes. Las marcas blancas en los segmentos indican mutaciones neutrales y las marcas rojas indican mutaciones que afectan las regiones antigénicas de las proteínas HA y NA. Las flechas naranjas indican la generación de reordenantes con segmentos de 2 ancestros diferentes. Así como continúen circulando estos virus, la inmunidad contra ellos se va creando en la población del hospedador, representado aquí por la disminución del ancho del ‘cuello de botella’. En paralelo, los virus con mutaciones que afectan las regiones antigénicas de la HA y NA se acumulan en la población viral. En algún punto, se genera una nueva variante antigénica indicada con rojo en el virus. Esta variante es capaz de causar dispersión de la infección y crea un grupo con cepas antigénicamente similares. (Extraído y adaptado de McHardy y col, 2009).

Numerosos estudios experimentales y análisis estadísticos de datos genéticos y antigénicos han identificado grupos de residuos en la HA y NA, llamados epítopes, que se unen a los anticuerpos humanos (Laver y cols, 1982). Como consecuencia, los epítopes tienden a evolucionar rápidamente, para así evadir la inmunidad. Más aún, diversos estudios recientes muestran una serie de aminoácidos en sitios específicos de la HA que evolucionaron bajo una selección positiva durante los últimos 40 años (Blackburne y cols, 2008).

Además del escape a los anticuerpos humanos, otras fuerzas selectivas actúan en la HA. Como proteína funcional, la HA debe mantener su estabilidad y función. Entonces, las mutaciones que escapan a los anticuerpos no deben comprometer esas propiedades de la HA. Numerosos estudios de evolución de proteínas in vitro así como estudios en bacterias y virus han mostrado que las mutaciones beneficiosas son a menudo pleiotrópicas: además de su efecto beneficioso original, causan algunos, usualmente negativos, efectos secundarios en otras propiedades de la proteína, tales como en la estabilidad (Bloom y col, 2009). Estos efectos negativos pueden ser aliviados o compensados por otras mutaciones, haciendo que ciertas combinaciones de mutaciones sean más beneficiosas que una simple mutación por separado (SanJuan y cols, 2005). Este fenómeno es conocido como epistasis positiva entre mutaciones (de Visser y col, 2007). La epistasis también puede ser negativa si la combinación de mutaciones da como resultado una baja capacidad replicativa respecto a lo esperado cuando ocurren mutaciones individuales (de Visser y col, 2007).

Estudios recientes de la secuenciación del genoma a gran escala y la tipificación antigénica ha mejorado considerablemente nuestro conocimiento en cuanto a la evolución de los virus de la influenza: epidemias mundiales surgen de reservorios ubicados básicamente en la región este-sudeste de Asia en donde hay circulación constante del virus; cepas antigénicamente similares predominan durante las epidemias mundiales por muchos años antes de ser remplazadas por nuevas cepas (McHardy y col, 2009).

1.9.1. Virus de la influenza A/ H3N2

Los virus del subtipo H3N2 aparecieron en humanos en la pandemia de 1968 y han estado circulando desde entonces, causando morbilidad y mortalidad en sucesivas epidemias. A diferencia de los virus A/H1N1, los virus A/H3N2 evolucionan más rápidamente (Rambaut y cols, 2008) y son el subtipo más dominante seguido luego por los virus de la influenza B y luego A/H1N1 (Finkelman y cols, 2007).

Estudios de secuencias de virus de la influenza A de origen humano sugieren que han evolucionado a partir de un único linaje (Yamashita y cols, 1988). Sin embargo, sublinajes diferentes de virus influenza A/H3N2 pueden co-circular en humanos en períodos cortos. Se han identificado mediante ensayos de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) dos grupos diferentes de variantes antigénicas de A/H3N2 a fines de la década de 1980 (CDC, 1991).

Estos grupos estaban representados por las cepas A/Beijing/353/89 y A/Shangai/24/90 y virus similares co-circularon entre 1990 y 1992. Como los virus H3N2 están frecuentemente asociados con un exceso de mortalidad en adultos mayores a 65 años y en personas que tengan riesgos asociados a complicaciones debido a la influenza, es de gran importancia que la cepa vacunal coincida con la cepa circulante. Desde 1972 a la fecha, veinte cepas H3N2 fueron utilizadas como componente vacunal. Por el contrario los once cambios del componente de influenza B y los siete del componente H1N1 realizados durante el mismo período demuestran la menor variabilidad de estos virus (Pumarola y cols, 2002).

A pesar de que existe una variación considerable en las secuencias entre variantes epidémicas, el grado de homogeneidad de las mismas dentro de una epidemia puede ser sorprendente. Luego de la aparición de una nueva variante epidémica tendría que haber poca variación en la secuencia a nivel de aminoácidos. Por ejemplo, cepas H3N2 aisladas de regiones geográficamente diferentes durante un período de nueve meses en 1987 mostraron pocos cambios de aminoácidos en sus moléculas de HA (Cox y cols, 1993). La variación antigénica observada en estas cepas parece ser el resultado de la selección hospedador-célula durante el aislamiento y pasaje de los virus en el laboratorio. Los virus de la influenza de origen humano están rutinariamente adaptados a crecer en huevos embrionados de gallina antes de realizar la caracterización antigénica para propósitos epidemiológicos, y dichos procedimientos resultan en la selección de variantes (Robertson y cols, 1985). Dichas variantes poseen sustituciones únicas de aminoácidos en la HA en la vecindad del sitio de unión al receptor (Robertson, 1993), los cuales pueden tener considerables efectos en la antigenicidad del virus (Katz y cols, 1987). Es importante entonces, el monitoreo de las secuencias de HA de tales cambios derivados de laboratorios para distinguir de aquellos que ocurren en la naturaleza.

La evolución de la HA de los virus H3N2 incluye largos períodos (3 a 8 años) de evolución neutral sin un aparente cambio antigénico sustancial (períodos estáticos) que están caracterizados por un exceso de sustituciones sinónimas más que no sinónimas, una lenta extinción de linajes de virus que coexisten y poca asociación de remplazos de aminoácidos en regiones de epítipo. Estos largos períodos estáticos están delimitados por períodos cortos de rápida evolución en donde nuevos linajes dominantes rápidamente desplazan a linajes anteriormente circulantes. La preponderancia de la selección positiva durante los intervalos de rápida evolución está basado en un exceso de aminoácidos remplazados principalmente en las regiones del epítipo de la HA, en comparación al remplazo en otras partes de la molécula. En los períodos de rápida evolución muchos clados exhiben evolución dentro de un mismo sub-

clado mientras que en los períodos estáticos se ve una amplia distribución de remplazos aminoacídicos a lo largo de toda la molécula de la HA. Árboles filogenéticos que ilustran la evolución de la HA de los virus H3N2 tiene forma de “cactus”, con un tronco prominente que representa la sucesión de linajes de virus sobrevivientes en el tiempo y brazos típicamente cortos que estarían explicando que la mayoría de las cepas se van extinguiendo y que la diversidad viral es limitada en el tiempo (Wolf y cols, 2006; McHardy y col, 2009).

A escala global la evolución antigénica de los virus H3N2 ha sido marcadamente homogénea. Una explicación para esta homogeneidad podría ser que los virus circulan globalmente más que persistir y evolucionar localmente (Nelson y cols, 2006). De 2002 a 2007 se pudo observar que las cepas H3N2 que aparecieron, lo hicieron en países del este-sudeste de Asia, en promedio, 6 a 9 meses más tempranamente que en otras regiones, con largas demoras para llegar a Sudamérica, siendo típicamente otros 6 o 9 meses más. El solapamiento de epidemias en dicha región de Asia crea una red de circulación en donde los virus H3N2 están continuamente circulando dentro de la región. El gran movimiento de la población entre el este-sudeste de Asia y Oceanía, Europa y Norteamérica y la débil conexión con países de Sudamérica, podría explicar la demora de la llegada de las nuevas cepas H3N2 a cada una de las regiones antes mencionadas (Russell y cols, 2008).

1.9.2. Virus de la influenza A/ H1N1

Los virus de la influenza A del subtipo H1N1 han circulado en dos períodos diferentes en los últimos cien años y han tenido un gran impacto epidemiológico en humanos. El primer período fue entre 1918 y 1957 y el segundo desde 1977 hasta el día de hoy. Sin lugar a dudas la pregunta con más incógnitas está relacionada a cómo y de dónde apareció la cepa A/H1N1 altamente virulenta de 1918 que mató de 20 a 50 millones de personas, siendo así la pandemia más importante del siglo pasado. Luego de 1918, la cepa H1N1 continuó circulando en humanos, causando epidemias estacionales de variada severidad y también en poblaciones de cerdos, como influenza “clásica” de origen porcino (Taubenberger y cols, 2001). En 1947, el virus H1N1 sufrió cambios antigénicos importantes de tal magnitud que provocó la falla total de la cepa vacunal de dicho año (Rasmussen y cols, 1948). Si bien la cepa no causó gran mortalidad, el virus se expandió por todo el mundo comportándose como una cepa pandémica (Sartwell y col, 1948). Otra epidemia inusual de A/H1N1 ocurrió en 1950, en donde las tasas

de mortalidad fueron superiores a las ocurridas en las pandemias de 1957 y 1968 (Viboud y cols, 2006). En 1957 la cepa A/H1N1 desapareció y fue sustituida por la cepa pandémica H2N2 (Scholtissek y cols, 1978). En 1977, la cepa A/H1N1 reapareció luego de 20 años de ausencia siendo los más vulnerables a la enfermedad niños y adultos jóvenes, mientras que los adultos mayores que estuvieron expuestos a la enfermedad antes de 1957 estaban protegidos contra la influenza. Análisis de secuencias de cepas H1N1 mostraron que había gran similitud genética entre la HA de 1950, A/Fort Warren/50, y la cepa que re-apareció en 1977, A/USSR/77 (Raymond y cols, 1986). Los virus de 1977 parecían estar evolucionando de igual manera que aquellos que circularon en 1950. Comparaciones realizadas por Nelson y colaboradores (Nelson y cols, 2008), de secuencias A/H1N1 que circularon entre 1918 y 2006 evidenciaron notablemente que las cepas aisladas de 1947 y 1950 mostraban eventos de reordenamiento intra-subtipo, principalmente en los genes HA y NA. Las secuencias obtenidas para el gen de la HA mostraron gran similitud con cepas H1N1 que circularon más adelante en el tiempo, mientras que las secuencias del gen de la NA evidenciaron estar relacionadas a cepas H1N1 que circularon en años previos a 1947 y 1950. Si bien el gen de la HA mostraba grandes variaciones, el gen de la NA se mostraba más conservado (Nelson y cols, 2008). Eventos de reordenamiento de genes intra-subtipo es un factor importante en la evolución a largo plazo de los virus de la influenza A, ya que los múltiples segmentos involucrados juegan un rol importante en la generación de cepas epidémicas, fenómeno recientemente demostrado también en virus de la influenza A/H3N2 (Holmes y cols, 2005).

Los brotes epidémicos causados por los virus influenza A/H1N1 presentan características peculiares: a) difusión lenta, b) morbilidad escasa, c) los casos cursan de forma moderada y a menudo inaparente y d) la mayoría de casos se dan entre adultos jóvenes. Aunque los virus H1N1 estacionales están asociados con una menor mortalidad que los virus H3N2 o los H1N1pdm, en algunos años son cepas dominantes entre las infecciones por virus de la influenza en humanos y tienen un alto impacto en la salud pública.

En ambos hemisferios, las cepas A/H1N1 parecen ser menos vulnerables a la generación de “cuellos de botella” como sí ocurre en los virus A/H3N2, sugiriendo que los linajes genéticamente diversos de A/H1N1 están más adaptados a coexistir respecto a cepas A/H3N2. Esto indicaría que la selección antigénica actúa menos potentemente en cepas A/H1N1, manifestándose con tasas menores de cambios de aminoácidos en el gen HA, de manera que la selección de los linajes se hace más lenta (Rambaut y cols, 2008).

1.9.3. Neuraminidasa

A pesar de que anticuerpos anti neuraminidasa no neutralizan la infectividad del virus, sí contribuyen a modificar la enfermedad (Deroo y cols, 1996) dado que la respuesta inmune a la NA también tiene un rol importante en la epidemiología del virus de la influenza. Los cambios antigénicos que ocurran en la NA lo hacen independientemente de los cambios que ocurran en la HA (Abed y cols, 2002). La comparación de cinco genes del subtipo N1 de virus aislados entre 1933 y 1983 muestra un alto grado de mutaciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos a lo largo del tiempo. Además, análisis filogenéticos de secuencias nucleotídicas de genes del subtipo N2 de treinta y tres cepas H3N2 aisladas entre 1968 y 1995 demuestran que al igual que para la H3, el gen de la NA evolucionan como dos linajes diferentes representados por A/Beijing/32/92 y A/ Beijing/353/89 (Xu y cols, 1996). También se observó reordenamiento genético de genes N2 entre ambos linajes durante su co-circulación.

Estudios recientes indicaron que ciertas mutaciones en la NA permiten a la molécula ser más promiscua a otras mutaciones que le confieran resistencia a antivirales (Bloom y cols, 2010; Yang y cols, 2011).

1.9.4. Comparación de los modelos evolutivos de virus de la influenza A, B y C

La comparación de la divergencia de secuencias entre genes del tipo A, B y C sugiere que en humanos los virus de la influenza B y C evolucionan más lentamente respecto a los virus de la influenza A.

La divergencia entre el gen de la HA de los virus de la influenza A y B aparentemente ocurrió antes de que comenzaran a diverger algunos subtipos de los virus de la influenza A. La divergencia más temprana en el tiempo entre los subtipos de virus de la influenza A ocurrió hace aproximadamente 2000 años atrás, mientras que la divergencia entre los virus de la influenza A y B se estima ocurrió hace más de 4000 años y la divergencia entre los 3 tipos de virus influenza (A, B y C) fue hace aproximadamente 8000 años atrás (Suzuki y col, 2002).

La tasa de evolución de genomas ARN es dependiente de varios factores que incluyen errores de frecuencia de las enzimas replicativas, selección para variantes por el sistema inmune de poblaciones parcialmente inmunes y selección contra variantes impuestas por restricciones estructurales y funcionales de las proteínas virales. Han habido controversias de cómo la evolución de los virus influenza es el resultado de selección positiva o de cambios neutrales al azar. La mayoría de las secuencias aminoacídicas están fuertemente conservadas respecto a las secuencias nucleotídicas. En los virus de la influenza A, alrededor del 50% de los cambios nucleotídicos en las secuencias HA y NA resultan en cambios aminoacídicos (Air y cols, 1990).

1.9.5. Variaciones en los genes de las proteínas internas

La evolución continua es más prominente en las glicoproteínas de superficie, pero también ocurre en cada uno de los restantes seis genes internos de los virus de la influenza. Si bien se han determinado las tasas evolutivas de éstos genes (Kawaoka y cols, 1989), las mismas son menores que en la HA y NA. Además, la proporción de cambios no codificantes (silenciosos) es mayor en algunas proteínas internas (PB2, NP, M1) respecto a la HA del subtipo H3 (81-95% contra 57%), lo cual revela diferencias en sus modos de evolución. Dentro del segmento M, el cual contiene dos marcos de lectura solapados, los genes M1 y M2 evolucionan de manera diferente. El gen que codifica para el canal iónico M2 evoluciona más rápidamente y con una mayor proporción de cambios no codificantes respecto al gen M1, el cual no ha mostrado cambios codificantes acumulativos en los últimos 55 años (Ito y cols, 1991).

1.10. RESPUESTA INMUNE

El virus de la influenza causa una infección aguda en el hospedador e inicia una cascada de reacciones inmunes activando así todas las defensas del sistema inmune. La recuperación por una infección de virus de la influenza involucra tanto una respuesta humoral como una respuesta celular. Las proteínas de superficie son las de mayor importancia en la respuesta humoral, y las proteínas internas predominan en la respuesta celular. Los anticuerpos de las mucosas (IgA) y de suero (IgG) generados frente a la molécula de la HA neutralizan la infectividad del virus y son la primera barrera de resistencia a la infección. La respuesta IgG a la HA es subtipo específica, pero la acumulación de mutaciones puntuales (deriva antigénica) permite que el virus escape a la destrucción por los anticuerpos.

1.10.1. Inmunidad humoral

La inmunidad adquirida tras la infección por virus de la influenza es específica del subtipo y de la variante responsable. Depende, fundamentalmente, de la respuesta humoral frente a los antígenos superficiales del virus, sobre todo frente a la hemaglutinina y en menor proporción a la neuraminidasa, siendo menos conocido el papel que juega la inmunidad de base celular, tan importante en otras infecciones víricas.

Tras la primoinfección natural por los virus de la influenza aparecen anticuerpos (Acs) en el suero de los pacientes frente a la HA y NA así como frente a la proteína M y la NP. Estos últimos son tipos específicos y de un valor protector limitado, pero resultan de utilidad para el diagnóstico por fijación de complemento.

Los Acs anti-hemaglutinina son la base de la inmunidad protectora humoral en la gripe; neutralizan la infectividad del virus por bloqueo del dominio de adhesión en la subunidad HA1 y duran de por vida a títulos variables pero superiores a 1/40.

Los Acs anti-neuraminidasa se producen a menor título y algo más lentamente y su efecto protector se basa en la limitación de la difusión del virus en el tracto respiratorio y al resto del organismo, ya que bloquean la liberación de los virus tras el ciclo replicativo. Tanto los Acs anti-hemaglutinina como frente a la neuraminidasa son específicos de cepa o variante y algo menos de subtipo; esta especificidad tan estrecha de los principales anticuerpos protectores

explica en gran parte la susceptibilidad a la infección por nuevas cepas variantes de virus de la influenza.

La distribución por edades demuestra más frecuentemente la presencia de Acs frente a subtipos A/H1N1 en personas mayores como consecuencia de infecciones pasadas. Sin embargo, la deriva antigénica que muestran las variaciones menores del virus limitan mucho la duración de la inmunidad frente a la infección gripal, que según la importancia del deslizamiento antigénico, varía entre 1 a 5 años. Por otra parte, las infecciones repetidas por variantes menores de un mismo subtipo aumentan la resistencia a la infección por dicho subtipo.

1.10.2. Inmunidad celular

La respuesta inmunitaria celular juega un importante papel en la patogenia de la infección gripal y en la recuperación de la enfermedad ya establecida. En el curso de la infección se observa un incremento de los mecanismos de la inmunidad innata y con frecuencia inmunosupresión de algunos mecanismos de la inmunidad celular. Las células T, quienes median la respuesta inmune celular, tienen como blanco proteínas internas que son comunes a las de los virus influenza heterólogos. Esta propiedad proporciona a las vacunas, que inducen una respuesta inmune celular, el potencial de protección contra cepas virales heterólogas. En humanos hay dos tipos de células T efectoras: T-CD4+ y T-CD8+. Ambas contribuyen a la inmunidad frente a una infección causada por el virus de la influenza (Murphy y col, 1996).

La respuesta inmunitaria celular está mediada por células T CD4+, con restricción CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad), fundamentalmente subtipo específicas, y su función principal es la colaboración para la producción de anticuerpos. Pertenecen a la clase de células T o células T-colaboradoras. Estas células CD4+ tienen dos propiedades funcionales. Primero, son células T colaboradoras que ayudan a las células B para la producción de anticuerpos y a los linfocitos T de clase I para su proliferación. Segundo, las CD4+ pueden tener actividad citolítica con un rango de especificidad de antígeno parecida a la de los linfocitos T de clase I (Murphy y col, 1996).

Las células T CD8+ con restricción CMH clase I son tipo específicas, dirigidas preferentemente a los antígenos NP y M. El fenotipo CD8+ está restringido a los antígenos de histocompatibilidad de clase I (CMH I). Estos linfocitos T citotóxicos aparecen en la sangre

de individuos infectados o vacunados entre los días seis a catorce y desaparecen al día veintuno (Ennis y cols, 1981).

1.10.3. Producción de interferón

Los virus de la influenza son sensibles a las propiedades antivirales del interferón y son eficientes inductores de interferón durante la infección (Hill y cols, 1972). El interferón es detectado durante la fase aguda de la enfermedad en las secreciones del tracto respiratorio alto y en el suero de pacientes infectados con el virus (Green y cols, 1982). Existe correlación directa entre el nivel de multiplicación del virus y la cantidad de interferón inducido (Murphy y cols, 1973). El interferón- α (IFN- α) está presente en el suero durante la fase aguda de la infección, pero no se conoce que tipo es el que se encuentra presente en el tracto respiratorio (Green y cols, 1982). Cuando se estimula in vitro con células infectadas o virus purificado, los linfocitos cultivados a partir de personas recientemente vacunadas secretan IFN- γ o IFN- α (Ennis y cols, 1981). Poblaciones de linfocitos también pueden producir IFN- γ o IFN- β en respuesta a una infección in vitro con virus influenza A (Yamada y cols, 1986). Se cree que el IFN contribuye a la recuperación de la infección.

1.11. PREVENCIÓN Y CONTROL

1.11.1. Antivirales

Las vacunas juegan un rol crítico en la prevención de la influenza. Sin embargo, la eficacia de esta intervención puede estar significativamente reducida debido a diferencias entre la cepa vacunal y la cepa circulante y la inhabilidad del hospedador de generar una buena respuesta inmune. El potencial impacto de una pandemia por virus influenza hace que medidas efectivas para limitar la dispersión y morbilidad de la infección sea una prioridad en salud pública. Es entonces que los antivirales juegan un rol importante en la prevención y manejo de la influenza.

Son dos las clases de drogas que están disponibles para la profilaxis y tratamiento de la infección por virus influenza: inhibidores de canal iónico M2 (amantadina y rimantadina) y los inhibidores de la neuraminidasa NA (oseltamivir y zanamivir).

Este tipo de drogas pueden reducir las complicaciones asociadas, la severidad y la duración de la enfermedad si se comienzan a utilizar dentro de las primeras 48 horas luego de iniciados los síntomas (Younkin y cols, 1983).

La terapia antiviral reduce la duración de liberación del virus, riesgo de contraer neumonía y, posiblemente, la mortalidad asociada con influenza en pacientes inmunocomprometidos, (Ison y col, 2002). Sin embargo, alguno de estos pacientes pueden desarrollar una replicación viral sostenida a pesar del tratamiento antiviral, lo cual sería un factor de riesgo para la aparición de cepas resistentes a los antivirales (Gubareva, 2004).

Tabla 3. Diferencias y similitudes relevantes entre las dos clases de antivirales para el manejo y profilaxis de la influenza.

Aspecto	Amantadina/Rimantadina	Oseltamivir/Zanamivir
Estructura o función blanco	Proteína M2	Inhibidor neuraminidasa
Espectro antiviral	Restringido. Sólo influenza A	Amplio. Influenza A y B
Efectos secundarios	Amantadina : Insomnio, confusión o delirio. Rimantadina con menor tasa de efectos adversos	Zanamivir : tos, broncoespasmo. Uso contraindicado en pacientes con enfermedades crónicas. Oseltamivir: mayor frecuencia de náuseas , vómitos y dolor abdominal.
Biodisponibilidad y vía de administración	Buena disponibilidad;ambas se usan por vía oral	Buena disponibilidad en el caso de oseltamivir y baja en el caso de zanamivir que obliga a ser usada por vía inhalatoria.
Eficacia en tratamiento de influenza y dosis	Comprobada. Mayor alivio sintomático con amantadina en relación a ác.salicílico. Dosis: 100 o 200 mg al día durante 5 días.	Comprobada y útil para influenza A y B. Dosis oseltamivir:75 mg por día durante 5 días. Zanamivir: una inhalación oral de 10 mg 2 veces por día durante 5 días.
Resistencia	Emergencia de resistencia frecuente durante su uso limita su utilización prolongada	Menor emergencia de resistencia.

1.11.1.1. Inhibidores de canal iónico M2

La amantadina y rimantadina son derivados químicos de los adamantanos. La amantadina es un antiviral aprobado por la FDA en 1976 para el tratamiento de infecciones por virus de la influenza tipo A. Su análogo, la rimantadina, fue aprobado a principio de los años 90. Ambos tienen una estructura tricíclica con un grupo amino y poseen actividad antiviral contra el tipo A pero no contra el tipo B ni C (Van Voris y col, 1992).

Si bien los adamantanos están asociados con varios efectos secundarios, han sido ampliamente usados por muchos años quizás debido a su amplia disponibilidad y bajos costos.

Mecanismo de acción

Los adamantanos bloquean la actividad de canal iónico de la proteína M2 en los virus influenza A, evitando así el cambio de pH necesario para la liberación del ARN viral al citoplasma y posterior replicación del virus (figura 13) (Wang y cols, 1993).

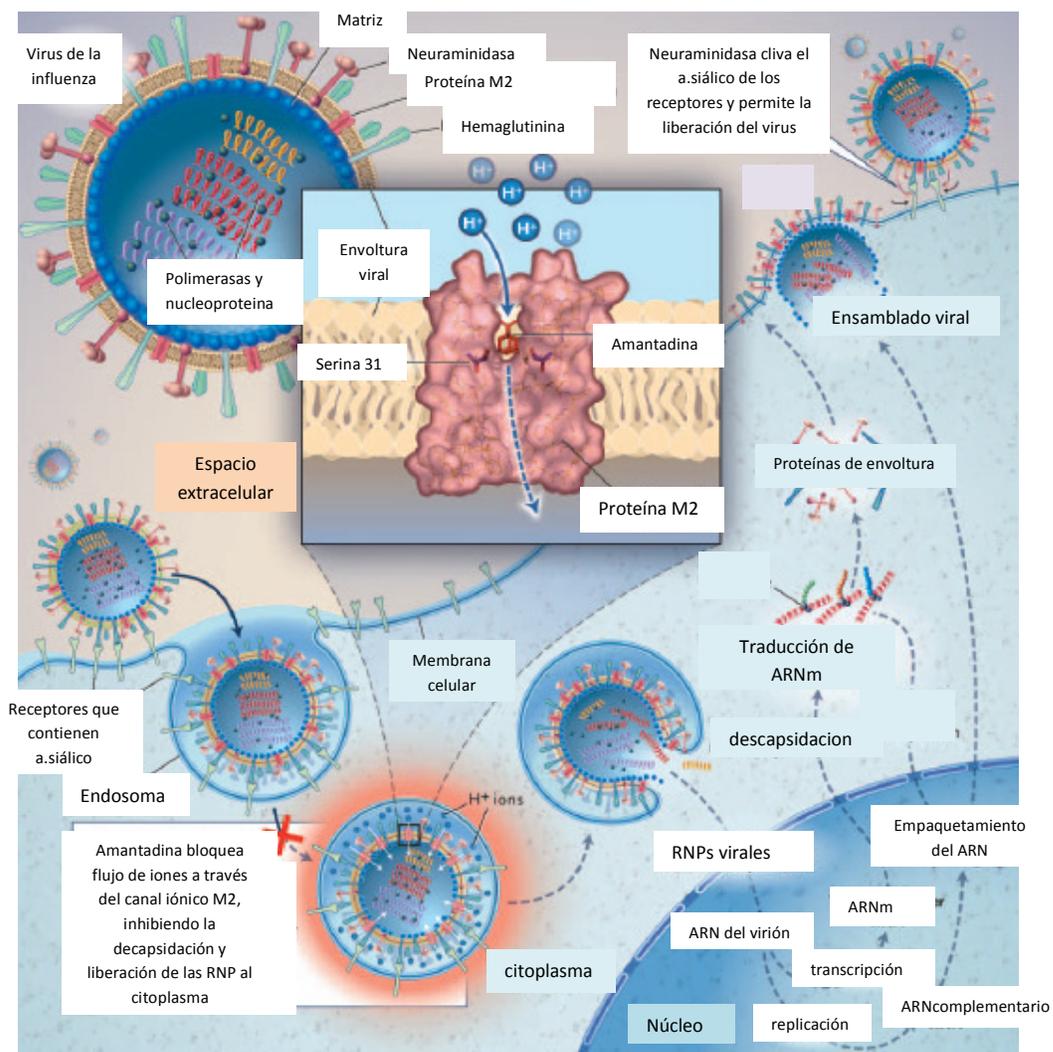


Figura 13. Mecanismo de acción y desarrollo de resistencia de los inhibidores de la proteína M2. En ausencia de amantadina, el canal iónico medía el influjo de iones H⁺ hacia el interior del virión, lo cual facilita la disociación de las ribonucleoproteínas y su liberación al citoplasma para ser transportadas al núcleo de la célula. En presencia de amantadina, el canal iónico es bloqueado y la replicación es inhibida. El reemplazo de la serina en la posición 31 por un aminoácido más voluminoso como la asparagina lleva a la disociación de la amantadina y por lo tanto a la restauración de la función de canal iónico. Dependiendo del aminoácido en particular, otras mutaciones en las posiciones 26, 27, 30 o 34 pueden inhibir la unión de la amantadina o permitir la unión pero sin pérdida de la función de canal iónico. (Extraído y adaptado de Hayden , 2006).

Resistencia a los inhibidores de M2

Luego de cuatro décadas de uso efectivo de los adamantanos en la prevención y tratamiento del virus influenza, la resistencia global a estas drogas ha aumentado dramáticamente entre cepas A/H3N2 en los últimos años. En la mayoría de los casos, la base para dicha resistencia es un único cambio aminoacídico (S31N) en la proteína M2, la cual tiene un papel fundamental para el inicio de la replicación viral. La mutación S31N es una de los cinco cambios aminoacídicos posibles que puede tener la proteína M2 que se conocen tienen relación con la resistencia a los adamantanos (Klimov y cols, 1995).

Mientras a nivel mundial, menos del 2% de los virus influenza A/H3N2 que circulaban durante 1995-2002 eran resistentes a los adamantanos, se detectaron cepas resistentes en más del 12% de las cepas circulantes en 2004 (Bright y cols, 2005). Los porcentajes mayores de resistencia se observaron primeramente en Asia, particularmente en China, donde la prevalencia de cepas resistentes aumentó de 8.2% en 2002 a 73.8% en 2004. Para el año 2005, más del 90 % de las cepas H3N2 que circulaban en el mundo eran resistentes a los adamantanos (Bright y cols, 2006). Recientemente, la mutación S31N fue detectada en el 100% de virus Influenza en muchos países asiáticos. Desde 2006 el CDC en Atlanta recomendó el cese en el uso de adamantanos para el tratamiento o prevención del virus influenza (CDC, 2006).

La aparición de resistencia a adamantanos en países donde el uso de estas drogas no ha aumentado en los últimos años, implicaría mecanismos evolutivos más que presión selectiva de la droga (Simonsen y cols, 2007a). En particular, se ha propuesto que el aumento de la frecuencia global de la mutación S31N en la proteína M2 resulta de un evento al azar que

incluiría mutaciones ventajosas en otros segmentos del genoma viral, incluyendo mutaciones en la región HA1 del gen de la hemaglutinina en las posiciones 193 y 225 cerca del sitio de unión al receptor (Simonsen y cols, 2007a). Este evento de reordenamiento, ocurrido tempranamente en 2005, generó un nuevo linaje global de virus A/H3N2 resistentes, llamados linaje "N", con una HA antigénicamente caracterizada por A/Wisconsin/67/2005 y con una proteína M2 con la mutación S31N (Simonsen y cols, 2007a). A pesar de que el reordenamiento es una de las características importantes para la diseminación de cepas con resistencia, es posible que la presión selectiva aplicada en ciertas regiones de Asia sea el paso inicial para la aparición de la resistencia a adamantanos. En particular, el brote por síndrome respiratorio agudo (SARS) y la aparición de virus A/H5N1 en aves domésticas provocaron un aumento en el uso de este tipo de antivirales (Bright y cols, 2006; Deyde y cols, 2007). Además, se ha propuesto al sudeste asiático como el epicentro para la continua circulación de los virus influenza, con variantes que surgen de esta región antes de su diseminación al resto del mundo (Russell y cols, 2008).

Dado que el uso terapéutico de los adamantanos ha sido a un nivel constante y relativamente bajo por muchas décadas en áreas templadas, modelos simples basados en presiones selectivas de la droga no explicarían de manera adecuada, el aumento global de la prevalencia cepas resistentes a adamantanos en los últimos años (Simonsen y cols, 2007a). La aparición y dispersión de esta resistencia parece ser un proceso evolutivo complejo que incluye presiones selectivas geográficamente variables, extensa migración global y reordenamientos frecuentes. Las mutaciones que causan resistencia a los adamantanos no comprometerían la eficacia de replicación del virus o sus ventajas de transmisión, pudiendo ser transmitidos entre humanos sin una aparente pérdida de patogenicidad (Bright y cols, 2005).

La amplia mayoría de los virus de la influenza resistentes aislados entre 1997-2007 descienden de una única introducción, la cual fue primeramente detectada en 2003 en Hong Kong, donde circuló continuamente por al menos dos años y que también estaba presente en otras regiones del sudeste de Asia, antes de dispersarse al resto del mundo, para posteriormente sufrir el reordenamiento de 2005 del cual surgió el linaje "N" (Simonsen y cols, 2007a).

Los virus de la influenza H1N1pdm son resistentes a la amantadina y rimantadina (WHO, 2009c). Se ha reportado que la mutación responsable de esta resistencia está dada por la sustitución S31N (Dawood y cols, 2009; Shinde y cols, 2009). El gen M de esta cepa

pandémica es similar al gen M del virus porcino de Eurasia, el cual es resistente a ambas drogas.

1.11.1.2. Inhibidores de Neuraminidasa

Desde 1999 existen de forma comercial dos drogas: zanamivir vía inhalatoria (RelenzaTM) y oseltamivir vía oral (TamifluTM) los cuales han demostrado beneficios clínicos en la prevención y tratamiento por las infecciones de virus influenza (Moscona, 2006). También existen otros dos inhibidores con aprobación reciente en Japón, como el Peramivir (Babu y cols, 2000) y Laninamivir (Kubo S y cols, 2010), y otros en fase de desarrollo pre-clínico como A-315675 (Kati y cols, 2002) y A-322278 (Baz y cols, 2008).

Los primeros análogos del ácido siálico se diseñaron en los años 70, pero el diseño de inhibidores efectivos recién apareció cuando se estudió la estructura tridimensional de la NA y se localizó el sitio activo de la enzima. La estructura del zanamivir y oseltamivir están basadas en la estructura de un producto del ácido siálico generado por catálisis, el ácido 2,3-dehidro-2-deoxi-N-acetilneuramínico (DANA). En relación a DANA, el zanamivir tiene una única sustitución de un grupo guanidino en la posición 4' en el anillo glucídico. En cuanto al oseltamivir, este tiene más diferencias ya que tiene un anillo ciclohexeno en lugar del anillo glucídico, y tiene 2 sustituciones. En la posición 4' tiene un grupo amino y en la posición 6' la cadena lateral de glicerol está remplazada por un grupo pentil-éter (figura 14) (Ferraris y col, 2007).

Los inhibidores de NA si bien son más costosos, tienen menos efectos secundarios adversos respecto a los bloqueadores de M2 y se generan menos cepas resistentes (McKimm - Breschkin, 2000).

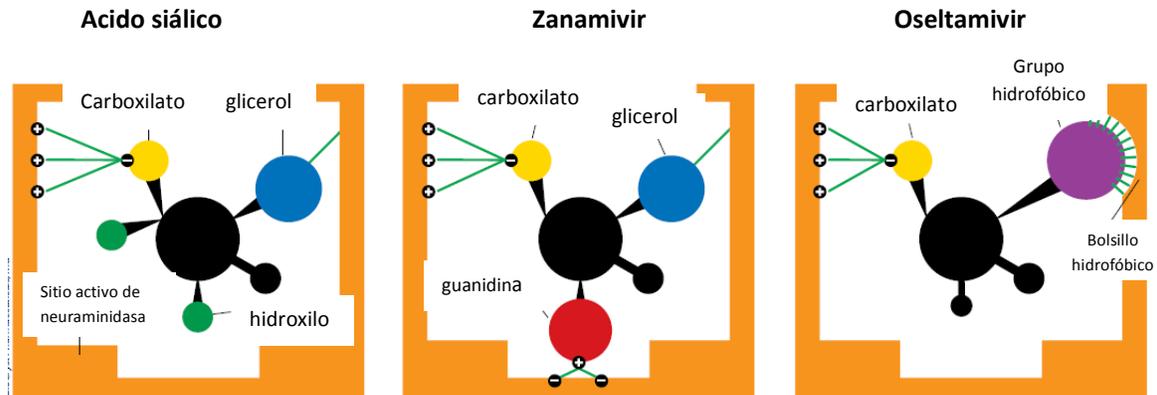


Figura 14. Drogas antivirales que bloquean el sitio activo de la NA. El oseltamivir y zanamivir se unen al sitio activo de la NA. El ácido siálico (sustrato que normalmente cliva la NA), se mantiene en el sitio a través de sus grupos glicerol y carboxilato que forman enlaces (líneas verdes) con aminoácidos del sitio activo. El zanamivir agrega otro enlace por remplazamiento del grupo hidroxilo del ácido siálico con un grupo guanidino (más grande y cargado positivamente), que forma uniones fuertes con dos aminoácidos cargados negativamente de la base del sitio activo. El oseltamivir mantiene la unión de su grupo carboxilato pero además usa su grupo hidrofóbico. Este grupo produce una hendidura y forma un bolsillo hidrofóbico que mantiene la droga en su lugar por medio de atracciones hidrofóbicas (líneas verdes cortas). (Extraído y adaptado de Laver y cols, 1999).

Mecanismo de acción

La neuraminidasa (NA) es un buen blanco para drogas antivirales porque juega un papel principal en la propagación del virus y los residuos aminoacídicos del sitio activo de la enzima NA, interaccionan directamente con el sustrato o rodean al sitio activo el cual es altamente conservado en los virus de la influenza A y B (Varghese y cols, 1998).

La actividad enzimática de la NA promueve la dispersión del virus influenza en las secreciones de la mucosa del tracto respiratorio y evita que la progenie viral forme agregados en la superficie de la célula de la cual brotará, removiendo entonces el ácido siálico de la zona.

Los inhibidores de la NA (INAs) son diseñados para limitar la infección por el virus, bloqueando el sitio activo de la enzima, evitando así la dispersión de los nuevos virus formados (figura 15) (Mendel y cols, 1998).

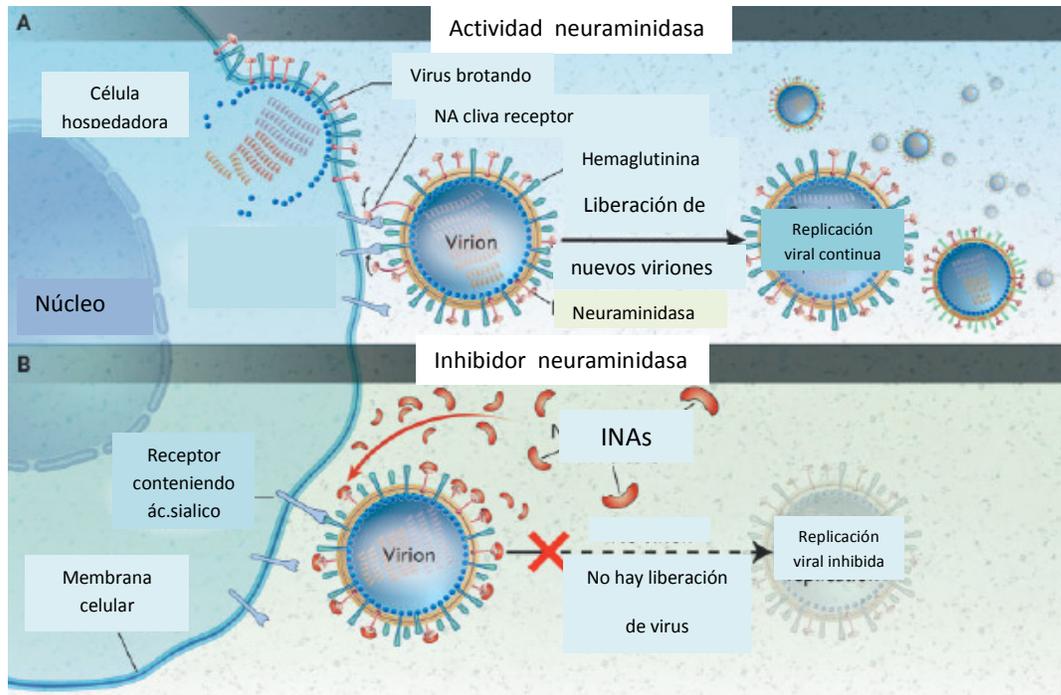


Figura 15. Mecanismo de acción de los inhibidores de la neuraminidasa. El panel A muestra la acción de la NA en el ciclo del virus de la influenza. La replicación es bloqueada por los INAs (panel B), los cuales impiden la salida de los viriones recién formados de la célula infectada. (Extraído y adaptado de Moscona, 2005).

Resistencia a inhibidores de la Neuraminidasa

A pesar de la eficacia obtenida en los ensayos clínicos, las diferencias en las concentraciones de los INA en el sitio de la replicación viral entre pacientes podrían contribuir a diferencias, no solo en la eficacia, sino también en el riesgo de la aparición de cepas resistentes a los INA. Bajas concentraciones de la droga que sólo bloquearían de manera parcial la replicación viral, podrían potenciar el riesgo al promover un ambiente propenso para la aparición de cepas resistentes (Reece, 2007).

Diferencias en la unión de los INA al sitio catalítico de la NA resulta en la generación de perfiles de resistencia diferentes. Mutaciones en la NA responsables de generar resistencia a oseltamivir varían de acuerdo al subtipo de NA; en los virus de la influenza A/H3N2, las mutaciones en el gen NA ocurren predominantemente en las posiciones E119 y R292 y en los virus A/H1N1 en la posición H274Y (Gubareva, 2004). La mayoría de las cepas resistentes a

oseltamivir (con mutaciones en las posiciones 119, 274, 292 o 294 del gen NA), permanecen sensibles a zanamivir (McKimm-Breschkin y cols, 2005). Las diferencias en los perfiles de resistencia de zanamivir y oseltamivir son atribuibles a diferencias en la unión de las drogas al sitio catalítico de la NA (Smith y cols, 2002). A diferencia del oseltamivir, el zanamivir está más estrechamente relacionado al ácido siálico y por lo tanto la unión del zanamivir al sitio activo de la NA es similar a la unión natural. De manera que el zanamivir puede ser ajustado en el sitio activo sin disturbar la conformación del mismo. Este cambio podría explicar la alta tasa de mutaciones de la NA luego del tratamiento con oseltamivir (Wang y cols, 2007). Sin embargo, las mutaciones R292K, E119V y H274Y se reproducen in vitro luego del tratamiento con oseltamivir y zanamivir (Blick y cols, 1995), de manera que la baja tasa de resistencia observada con zanamivir podría deberse a propiedades intrínsecas de la droga o el poco uso de ésta, comparado con el oseltamivir. La resistencia al zanamivir es extremadamente infrecuente, con solo un caso reportado de un niño inmunocomprometido infectado con virus de la influenza B (Gubareva y cols, 1998).

Como ya se mencionó, la estructura química del oseltamivir, pero no del zanamivir, facilitaría el desarrollo de mutaciones de resistencia que permitirían que la NA siga siendo funcional, haciendo que el virus resistente sobreviva y se propague. Para ubicar la cadena lateral del oseltamivir en el sitio activo, la NA sufre un cambio conformacional, generando así una hendidura. Por el contrario, el zanamivir se une al sitio activo sin necesidad de un cambio conformacional en la NA. Muchas mutaciones conocidas limitan este cambio conformacional e impiden entonces la unión al oseltamivir. El aminoácido E276 necesita rotar y unirse al residuo R224 para formar la hendidura necesaria para colocar la cadena lateral del oseltamivir. Las mutaciones R292K, N294S y H274Y impiden esta rotación y previenen la formación de la hendidura y por tanto generan resistencia al oseltamivir. Sin embargo estas mutaciones permiten la unión del sustrato natural para que los virus mutantes sobrevivan y se propagan. Estos virus mutantes son sensibles al zanamivir, ya que la unión al zanamivir no requiere ninguna re orientación de aminoácidos (Ferraris y col, 2007).

Aunque la resistencia a INA no ocurren frecuentemente in vivo, se han reconocido dos mecanismos de resistencia in vitro: el primero involucra una reducción en la eficiencia de unión de la HA al receptor; una menor eficiencia resulta en una reducción en la dependencia de la actividad NA durante la liberación del virus desde la célula infectada. Se han identificado sustituciones en la HA en virus seleccionados en presencia de INA (McKimm-Breschkin y cols, 2000), aunque el análisis de secuencias del gen HA es un pobre predictor

del fenotipo relacionado a la droga. El segundo mecanismo de resistencia involucra la sustitución de residuos conservados en el sitio activo de la NA con ó sin mutaciones compensatorias en la HA; dichas sustituciones pueden reducir la afinidad del sitio activo por el inhibidor (McKimm-Breschkin y cols, 1996).

A partir del año 2007, a nivel mundial se reportaron aumentos significativos en la frecuencia de cepas A/H1N1 con una mutación en la posición H274Y del gen de la neuraminidasa la cual confiere resistencia al oseltamivir (25% en Europa, 16% en las Américas y 4% en la región oeste del Pacífico) (WHO, 2008).

El aumento en la frecuencia de resistencia al oseltamivir es de preocupar ya que el oseltamivir es en la actualidad, el agente antiviral que más se utiliza para el control de las infecciones por virus influenza. Este aumento en la resistencia a oseltamivir, especialmente en cepas A/H1N1 entre 2007-2009, hizo que se aumente la utilización de zanamivir para el cual aún no se han reportado casos de resistencia (CDC, 2010). El cambio aminoacídico en la posición 274 (H274Y) del gen de la NA de los virus A/H1N1 es la más frecuente (Lackemby y cols, 2008). La circulación de cepas A/H1N1 resistentes no se correlaciona con el uso del oseltamivir, lo cual sugiere que la presión selectiva de la droga no está asociada con la transmisión continua, aunque sí podría haber estado involucrada en la aparición inicial.

En un trabajo realizado por Bloom y colaboradores (Bloom y cols, 2010), se reafirma que en ausencia de oseltamivir, la mutación H274Y tiene un efecto perjudicial en la capacidad replicativa del virus. Para que la mutación se “fije” a escala global, esto es, que ocurra en el 100% de la población viral, es entonces necesario que el efecto negativo de la capacidad replicativa sea apagada por mutaciones secundarias localizadas en algún lugar del genoma viral. Serían dos las sustituciones aminoacídicas en la NA que restaurarían la capacidad replicativa de los virus H1N1 con la mutación H274Y: V234M que disminuye la magnitud del defecto causado por H274Y y R222Q que aumenta la expresión de la NA en la superficie celular (Bloom y cols, 2010). Es posible que la existencia de mutaciones permisivas dé de alguna forma, el poder de predecir qué linaje viral será más susceptible a ser resistente a los antivirales en el futuro. Si sabemos de un linaje particular que tenga las mutaciones V234M y R222Q, sería adecuado investigar dicho linaje para futuras resistencias a antivirales que en aquellos donde no hay mutaciones permisivas (aunque está claro que otras mutaciones permisivas pueden estar en otros fondos genéticos). La buena noticia es que hasta ahora la mutación H274Y ha aparecido esporádicamente en los virus H1N1 pdm; en las más de 2500 secuencias de NA disponibles en el banco de datos de Influenza, solo un 1% tienen dicha

mutación. Tampoco se han detectado las mutaciones V234M y R222Q en las cepas H1N1 pdm. Puede ser posible que la mutación H274Y no se haya dispersado globalmente en las cepas H1N1 pdm porque éstas carezcan de las mutaciones permisivas esenciales (Holmes, 2010).

El balance funcional apropiado entre las actividades de las dos glicoproteínas de superficie de los virus influenza con el ácido siálico, por ejemplo, el receptor de unión (hemaglutinina) y la actividad sialidasa (neuraminidasa), es esencial para la capacidad replicativa viral (Wagner y cols, 2002). La afinidad aumentada de la neuraminidasa N1 de los virus que circularon en 2007-2008 por su sustrato no ha sido compensada por una afinidad aumentada de la H1 por el receptor. Entonces, los virus con la mutación Y274 que tienen solamente una levemente mayor afinidad por el sustrato como lo comparado con cepas H1N1 que han circulado previamente, tendrían un balance más apropiado de las actividades de sus HA y NA que los virus con la mutación H274 que tienen una afinidad tres veces mayor de su NA por su sustrato. La capacidad replicativa y la habilidad de ser transmitidas las cepas resistentes versus las sensibles estarían moduladas por características en otros genes. Para esto es necesaria la secuenciación del genoma completo. La circulación de virus H1N1 naturalmente resistentes a oseltamivir remarca el hecho de que las variaciones genéticas resultaría en variaciones en la sensibilidad al oseltamivir en ausencia de presión selectiva por la droga (Rameix-welti y cols, 2006). Las variaciones genéticas en la HA y NA son principalmente manejadas por la respuesta inmune, y las propiedades favorables que resultan en cambios de la capacidad replicativa del virus deberían ser co-seleccionadas. Las variaciones genéticas como estas demuestran la necesidad de un monitoreo cuidadoso en la afinidad de la NA por su sustrato e inhibidores de NA en relación con la afinidad de unión de la HA por su receptor en los virus influenza que circulan en la población, así como para virus influenza de origen aviar con potencial pandémico.

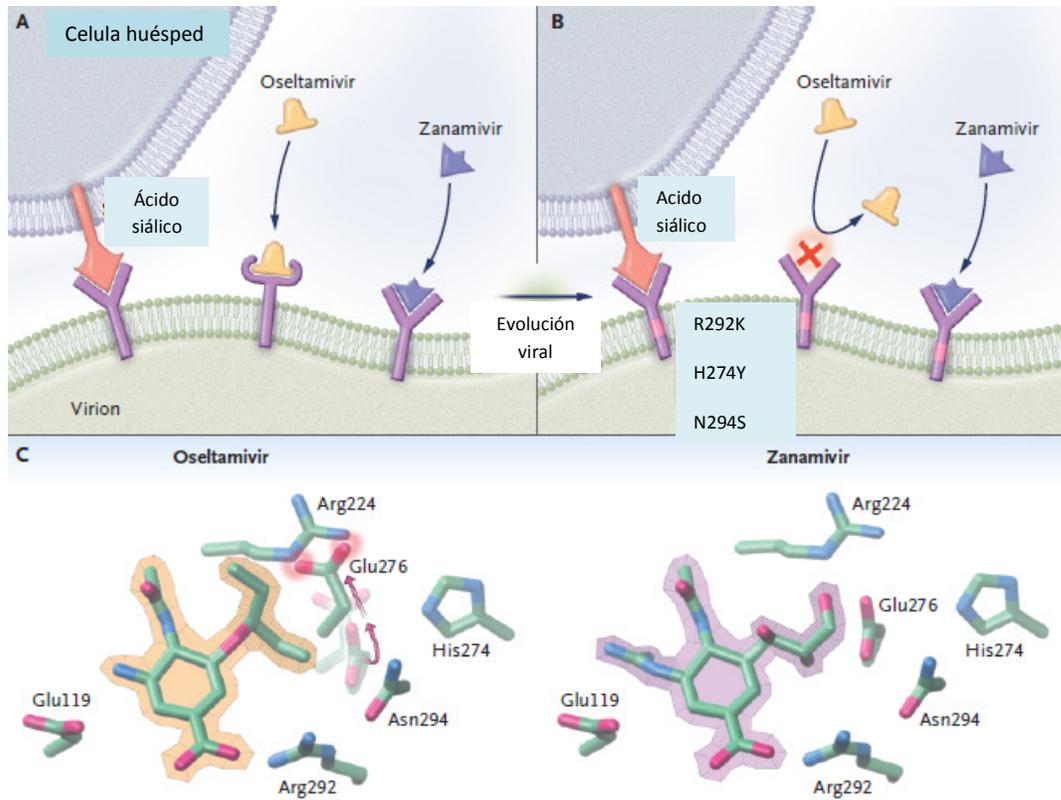


Figura 16. Mecanismo de resistencia al oseltamivir. El sitio activo de la enzima NA debe sufrir un cambio conformacional para crear la hendidura para el oseltamivir pero no para acomodar el zanamivir (panel A). Las mutaciones R292K, N294S y H274Y previenen la formación de esta hendidura y por lo tanto la unión del oseltamivir (panel B). Estos mutantes pueden unirse al ácido siálico y al zanamivir. En el panel C se muestra la hendidura donde se une el oseltamivir. Esta hendidura se crea cuando el residuo E276 rota y se une al residuo R224, eventos que son impedidos por la presencia de las mutaciones R292K, N294S, H274Y y E119V, y que por lo tanto resultan en la resistencia al oseltamivir. (Extraído y adaptado de Moscona, 2009).

1.11.1.3. Nuevos antivirales

Nuevos agentes antivirales son necesarios para el tratamiento de la influenza de modo de resolver las limitaciones de los actuales antivirales que se usan en ciertas áreas críticas: altas frecuencias de resistencia para inhibidores de M2, frecuencias variables de resistencia a oseltamivir entre cepas A/H1N1, eficacias limitadas en los tratamientos y falta de agentes parenterales para pacientes seriamente enfermos. Por esto, avances en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la replicación viral han revelado múltiples blancos que están siendo estudiados activamente para la búsqueda de nuevos antivirales.

Inhibidores de neuraminidasa parenterales

Los actuales antivirales se administran vía oral o inhalatoria. Estas rutas no proveen una confiable y rápida llegada de la droga al lugar de interés en pacientes gravemente enfermos. La administración parenteral del oseltamivir genera altas concentraciones en sangre de manera de aumentar las probabilidades de localizar la droga en el sitio de interés, especialmente con neumonía o infección extrapulmonar (Taylor y cols, 2008). El zanamivir, el cual tiene una pobre biodisponibilidad (2%), se está comenzando a evaluar por vía intravenosa y actualmente se encuentra en ensayos fase 2 a (Caas y cols, 1999). En voluntarios que recibieron 600 mg de la droga vía intravenosa, 2 veces por día durante 5 días mostró alta protección frente a la infección.

Inhibidores de neuraminidasa de larga duración

Biota Holdings de Australia y Sankyo Pharmaceuticals de Japón están co-desarrollando un nuevo INA de larga duración por vía inhalatoria. Hasta el momento CS-8958 muestra una buena actividad de el modelo murino para el tratamiento de la influenza con una única dosis semanal (MacDonald y cols, 2004). Esta droga que actualmente esta en fase 2 de experimentación, estaría mostrando que una única dosis sería tan efectiva como el tratamiento durante 5 días con oseltamivir para el tratamiento de una infección sin complicaciones (Biota Holdings, 2008).

Inhibidores de la polimerasa

T-705 (Toyama Chemical) no sólo es activo contra los 3 tipos de influenza (A, B y C) sino que también protege contra otras virus ARN, incluyendo algunos virus hemorrágicos (Furuta y cols, 2005). T-705 sufre ribosilación y fosforilación y entonces funciona como un nucleósido. Su mecanismo de acción primario es la inhibición de la ARN polimerasa viral. Es una droga que está en fase 2 de experimentación desde 2007-2008 y ha demostrado menores efectos adversos respecto a otros antivirales.

Combinación de terapias

La terapia combinada no es algo nuevo en el tratamiento para la influenza. En realidad, fue inicialmente probado en ensayos pre-clínicos años antes de que fuera el tratamiento a utilizar en el manejo de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Terapias en las que se utiliza inhibidores de M2 junto a INAs es una opción importante en pacientes muy graves y fue una alternativa sugerida recientemente por la OMS (WHO, 2007).

1.11.2. Vacunas

La forma más efectiva de reducir la morbilidad y mortalidad del virus de la Influenza es mediante la vacunación anual de personas con alto riesgo de complicaciones asociadas al virus. A diferencia de algunas enfermedades prevenibles con vacuna, la naturaleza cambiante del virus de la Influenza, endemidad mundial de los virus y persistencia de sus reservorios animales, convierten a la gripe en un blanco inapropiado de erradicación. Sin embargo, por más de 50 años han estado disponibles las vacunas contra la enfermedad y la existencia de una red de vigilancia epidemiológica mundial asegura la eficacia de los programas de vacunación. Cada año la OMS dedica recursos significativos para mantener la vigilancia mundial sobre cepas dominantes del virus de la influenza en los hemisferios norte y sur.

1.11.2.1. Eficacia de las vacunas

La eficacia de cualquier vacuna contra el virus de la influenza depende de cuan estrechamente se igualen las cepas de la vacuna con las cepas en circulación. Debido a que los principales tipos de virus en circulación en todo el mundo incluyen un tipo A/H1N1, un A/H3N2 y un tipo B, las vacunas se formulan para incluir un subtipo de cada tipo con características antigénicas similares a las cepas prevalentes en circulación, basado en recomendaciones hechas por la OMS. El sistema de vigilancia epidemiológica realiza una vigilancia continua para variantes que emergen, entonces emite recomendaciones a los fabricantes en el mes de febrero para la formulación de la vacuna para la temporada de gripe en el hemisferio norte, y a partir de 1988, en septiembre para la siguiente temporada en el hemisferio sur.

La vacunación contra el virus de la influenza evitaría hasta un 75% de las hospitalizaciones por complicaciones asociadas a la enfermedad (Shay, 2008). Las vacunas actuales son altamente efectivas en niños y adultos (70 a 90%). El grupo más vulnerable al virus de la influenza, los adultos mayores, es el menos afectado por la vacuna, con una eficacia promedio del 30 a 50% a los 65 años, y de 15 a 30 % en mayores de 70 años (Nichol y cols, 2007). Múltiples razones pueden hacer declinar la efectividad de la vacuna siendo la más común la disminución de las funciones inmunológicas y la fragilidad asociada a la edad (Simonsen y cols, 2007). Sin embargo la vacunación en personas mayores de 65 años reduce la mortalidad causada por complicaciones asociadas al virus en un 50% (Hak y cols, 2005).

La contradicción aparente entre vacunas con alta eficacia, pero baja efectividad reflejaría la dificultad en el diagnóstico del virus bajo condiciones clínicas y por el gran número de cepas que circulan en la población. Al contrario, durante una pandemia, donde una única cepa es la responsable de la enfermedad, una vacuna efectiva podría disminuir el número de casos y ser altamente efectiva para controlar la epidemia. Sin embargo, tal vacuna necesitaría ser producida y distribuida rápidamente para tener su máximo efecto (Simonsen, 2007).

1.11.2.2. Tipos de vacunas

Existen dos aproximaciones clásicas para las vacunas antigripales: las vacunas de virus inactivados y las de virus atenuados. Las vacunas actualmente comercializadas son vacunas predominantemente inactivadas las cuales se pueden clasificar en tres categorías en función de su composición antigénica (Heilman C, 1990; Kilbourne E, 1998; Ruben F, 1990).

Vacunas de virión completo, inactivado:

- * contienen partículas de virus completo de la gripe, inactivado pero con todas las proteínas, lípidos, antígenos (glicoproteínas) y ácido nucleico del virus
- * se producen por inoculación de huevos de gallinas fecundados, con virus de la Influenza después de un periodo de incubación de 2-3 días, las partículas se extraen, purifican e inactivan.

Las primeras vacunas producidas de esta manera fueron eficaces para prevenir la gripe, pero a menudo eran altamente reactogénicas. Hoy en día, los métodos de purificación utilizados producen vacunas que contienen niveles bajos de proteína contaminante de los huevos utilizados durante su producción. Cuando se utilizan en adultos, muestran una inmunogenicidad satisfactoria y reactogenicidad aceptable. Sin embargo, no es conveniente su uso en niños debido a una incidencia elevada de reacciones adversas.

Tras la vacunación con virus inactivados se produce una respuesta humoral frente a los antígenos de superficie, similar a lo que ocurre tras una infección natural. Las seroconversiones que se obtienen tienen una amplitud e importancia variable en función de la edad, función inmune de la persona, enfermedades crónicas subyacentes y, asimismo, de las cepas implicadas. La respuesta en este caso es fundamentalmente de tipo sérico con escasa o nula producción de anticuerpos locales de tipo secretorio y escasa respuesta celular.

Vacunas de partículas fragmentadas :

- * contienen antígenos de superficie HA y NA, así como otros antígenos
- * se producen al tratar partículas purificadas de virus completo con detergentes y disolventes orgánicos para eliminar los lípidos virales. Esto rompe la cubierta viral para dar una mezcla de componentes de proteína viral altamente inmunogénica.

Las vacunas de partículas fragmentadas fueron aprobadas en 1968 y tienen un buen perfil de tolerabilidad y pueden utilizarse en niños, adultos y personas de edad avanzada.

Vacunas de subunidades, o antígeno de superficie:

- contienen sólo antígenos HA y NA, si están adecuadamente purificados. Al igual que las vacunas fragmentadas, las vacunas de subunidades son menos reactogénicas que las vacunas de virus completo, inactivado debido a que se someten a mejores procedimientos de purificación.
- La investigación de nuevas vacunas es especialmente importante, ya que las actuales son lentas y caras de producir y deben ser reformuladas cada año.

El otro grupo conceptualmente diferente de vacunas lo constituyen las vacunas fabricadas con virus activos atenuados. Los mecanismos de atenuación responden a dos planteamientos básicos: la selección de cepas mutantes termosensibles, incapaces de replicarse a temperaturas superiores a 25-28 °C, y la obtención de cepas de virus recombinantes adaptadas al frío que poseen, además, los genes que codifican los antígenos de superficie HA y NA.

Hace pocos años se ha prestado especial interés en la formulación de nuevas vacunas denominadas de cuarta y quinta generación. Unas son las vacunas con adyuvantes y otras las vacunas virosomales. Estas dos aproximaciones diferentes comparten similares objetivos para mejorar la respuesta protectora en población anciana.

La investigación de nuevas vacunas es especialmente importante, ya que las actuales son lentas y caras de producir y deben ser reformuladas cada año. La secuenciación del genoma del virus de la influenza y el uso de la tecnología de recombinación genética pueden acelerar la aparición de la siguiente generación de cepas vacunales, permitiendo a los científicos colocar nuevos antígenos en cepas de vacunas previamente desarrolladas (Subbarao y col, 2007). Nuevas tecnologías están siendo desarrolladas para permitir el crecimiento de

virus directamente en cultivos celulares, mejorando las vacunas y disminuyendo los costos (Bardiya y col, 2005). La búsqueda de una vacuna universal para el tipo A, dirigida contra la superficie externa de la proteína transmembrana M2 (M2e), está siendo llevada a cabo en la Universidad de Gante por Walter Fiers y su equipo (Fiers y cols, 2004) y ha concluido con éxito la Fase I para ensayos clínicos.

1.12. SISTEMAS DE VIGILANCIA PARA VIRUS INFLUENZA

La importancia de la gripe como problema de salud pública reside tanto en la elevada morbilidad que origina en las poblaciones, provocando que un importante volumen de personas se vean afectadas por esta enfermedad en cortos períodos de tiempo, como en la mortalidad que puede ocasionar, tanto de forma directa como por agravamiento de otras enfermedades de base, sobre todo de naturaleza crónica cardio respiratoria en grupos denominados de riesgo. La gripe origina importantes costos sociales y sanitarios, unos derivados del absentismo laboral que provoca y otros debidos a los gastos que ocasiona su asistencia.

Aunque el primer aislamiento de virus Influenza tuvo lugar en 1930 en cerdos y hasta 1933 no se aisló de humanos, la gripe ha sido reconocida desde hace muchos siglos como enfermedad con gran impacto en la población, y su monitorización se ha realizado en base a su cuadro clínico y a las características epidemiológicas. En la actualidad, la combinación del estudio virológico, mediante la detección específica de los virus Influenza, y el estudio clínico-epidemiológico configura la base de la vigilancia de la gripe.

En 1947, la OMS estableció una red de vigilancia internacional de la gripe, que en la actualidad se asienta en el trabajo conjunto de cuatro Centros Colaboradores Internacionales (Tokio, Melbourne, Londres y Atlanta) y Centros Nacionales de Gripe, distribuidos en más de 80 países.

El intercambio de información y la ayuda entre los Centros Nacionales y los Colaboradores persigue varios fines: i) conocer cuáles son los virus gripales que están circulando, para realizar una correcta selección de las cepas que deben incorporarse a la vacuna de la siguiente temporada, dado que la eficacia de la vacunación dependerá en buena forma de la similitud entre la cepa vacunal y el virus circulante (Ansaldi y cols,2003; De Jong y cols, 2000).; ii) cuantificar la extensión de la epidemia de gripe y describir la distribución de los casos por edad, sexo, estado vacunal y otros datos de interés; iii) optimizar la efectividad de las medidas de prevención y control; iv) detectar en forma precoz la aparición de una nueva cepa pandémica.

Los laboratorios de los Centros Nacionales realizan el aislamiento de los virus gripales circulantes así como, en aquellas redes que así lo establezcan, las determinaciones de anticuerpos pre y post vacunales frente a los virus de la vacuna recomendada por la OMS en

cada temporada. Dependiendo de la dotación tecnológica de que dispongan, y de acuerdo con las prioridades que cada país asigna a la política de vigilancia gripal, confirman o determinan el tipo o subtipo de los virus aislados, o desarrollan un análisis genético o antigénico más profundo. Los Centros Nacionales de Influenza remiten los virus, parcialmente caracterizados, a los Centros Internacionales Colaboradores de la OMS, para que éstos realicen el análisis genético y antigénico comparativo de las cepas recibidas de los distintos países. El monitoreo antigénico y las variaciones genéticas de los virus influenza circulantes es crítico para la selección de las cepas vacunales de cada año.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Los objetivos generales de este proyecto de doctorado se enfocaron en el estudio evolutivo de los virus de la influenza A que han circulado en los últimos años en Uruguay y su comparación con otras cepas de la región y con las cepas vacunales recomendadas para el hemisferio sur.

Objetivos específicos

- 1- Determinar el grado de variabilidad genética y antigénica del gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H3N2 que han circulado en 1999-2007 en la población uruguaya.

- 2- Determinar el grado de variabilidad genética del gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H1N1 pdm que han circulado durante el año pandémico 2009 en Uruguay y en la región.

- 3- Investigar la presencia de cepas A/H1N1pdm resistentes a los antivirales.

- 4- Determinar la evolución del tamaño efectivo de las poblaciones virales de virus de la influenza A/ H1N1pdm a lo largo del tiempo, mediante análisis de coalescencia para los genes de la hemaglutinina y neuraminidasa.

- 5- Determinar la eficacia de la vacuna seleccionada para el hemisferio sur en el año 2009.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Determinar el grado de variabilidad genética y antigénica del gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H3N2 que han circulado en 1999-2007 en la población uruguaya.

3.1.1 Muestras clínicas

Se estudiaron 11 hisopados nasales obtenidos durante las temporadas invernales 1999 a 2007, en individuos con síntomas clínicos de Influenza, disponibles en el Centro Nacional de Referencia de Influenza, MSP, Montevideo, Uruguay.

Los hisopados nasales fueron tomados en población adulta utilizando hisopos *culturette*® de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se obtuvieron muestras de ambas fosas nasales.

3.1.2 Inoculación y crecimiento del virus

Las secreciones respiratorias fueron inoculadas sobre monocapas confluentes de células de riñón canino: MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells).

Dichas monocapas fueron crecidas previamente en MEM de crecimiento constituido por: Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (E-MEM) (Biowhittaker) conteniendo 10 % de suero fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina (300U/mL) y gentamicina (50 µg/mL) y glutamina (30 mg/mL). Una vez crecida la monocapa, se lavó con MEM de mantenimiento constituido por: E-MEM con penicilina (300U/mL), gentamicina (50 µg/mL), glutamina (30 mg/mL) y tripsina tratada con TPCK (tipo XIII de páncreas bovino) (4 µg/mL) (Sigma).

Se inoculó 200 µl de la muestra clínica (procesada y mantenida como se menciona anteriormente). Se dejó adsorber durante 30 a 45 minutos a 37° C y posteriormente se agregó 1 mL de MEM de mantenimiento, incubando los tubos en estufa roller a 33°C. Se realizó diariamente la observación microscópica de los cultivos inoculados y al detectar la aparición

de efecto citopático (ECP) o en caso negativo, luego de 7 días de incubación, se estudió la presencia de virus por hemoadsorción y hemoaglutinación.

Para el ensayo de hemoadsorción, se removió el sobrenadante guardándolo en criotubos con 0,2 mL de Seroalbúmina Bovina (BSA) al 3 % a -70°C y se cubrió la monocapa de células existente en cada tubo con 50 μl de glóbulos rojos de cobayo al 0,7 %. Posteriormente se observó al microscopio óptico.

3.1.3 Titulación viral

Para la titulación del virus de la influenza se realizó el ensayo de hemoaglutinación. Para ello se hicieron diluciones seriadas al medio del sobrenadante de la monocapa de células infectadas partiendo de 50 μl , con tampón fosfato salino (PBS), en una placa de microtitulación con pocillos en forma de "V", dejando una columna control (sólo PBS). Luego se agregaron 50 μl de glóbulos rojos al 0,7 % a cada pocillo y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta la decantación de los glóbulos rojos. A aquellas muestras que presentaban títulos mayores o iguales a 16 UHA se les realizó la Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA). A los cultivos que no presentaban el título suficiente para realizarles la IHA, se les realizó un segundo pasaje al día 7 con el fin de aumentar el título viral.

3.1.4 Caracterización de los aislamientos

Para la caracterización antigénica de los aislamientos se realizó la subtipificación inicial de las hemaglutininas de Influenza A/H3 por la técnica de Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) según el protocolo de OMS. Se utilizaron placas de micro titulación de 96 pocillos, glóbulos rojos de cobayo al 0,7 % en PBS, antígenos control, antiseros de referencia, control negativo de suero y PBS. Los antígenos y sueros de referencia fueron proporcionados por la OMS.

Las cepas caracterizadas fueron remitidas a la unidad de Influenza del CDC en Atlanta, para completar el estudio antigénico con una mayor variedad de antisueros, así como para la realización de los análisis genéticos correspondientes.

3.1.5 Detección de antígenos virales en muestras clínicas

Para la detección rápida de antígenos se procedió a realizar la técnica de inmunofluorescencia. Para dicho procedimiento diagnóstico se utilizan anticuerpos monoclonales específicos contra el virus de la influenza A (Chemicon International, Inc) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

El procedimiento técnico fue controlado con el uso de láminas positivas y negativas comerciales (Chemicon International, Inc).

3.1.6 Extracción de ARN, amplificación para una región del gen HA subtipo H3N2 y secuenciación.

La extracción de ARN total se realizó a partir de una alícuota de muestra clínica mediante el uso de Trizol (Gibco BRL) de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado usando 5 µl del extracto de ARN, 1 µl de oligonucleótidos hexaméricos al azar (pdN)₆ de 50 ng (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) y 1 µl de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 10 mM (Invitrogen). La mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos en termociclador (Biometra). Posteriormente se enfrió en hielo, se centrifugó 10 segundos y se calentó a 25 °C durante 10 minutos. Se agregaron 12 µl de una solución compuesta por 5 µl de un tampón 5X (250 mM Tris-HCl (pH 8.4), 375mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen), 2 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen) y 6 µl de agua con RNAsin. Se calentó la mezcla a 37 °C durante 2 minutos agregando posteriormente a cada muestra 1 µl de la enzima transcriptasa reversa del virus de leucemia murino (MMLV) de 200 U/µl (Invitrogen). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 50 minutos y luego 15 minutos a 70 °C. La reacción de transcripción reversa se controló con controles positivos (extractos de ácidos nucleicos de cepas stock) y negativo (usando agua en lugar de ácido nucleico).

Se realizó una múltiplex RT-PCR Nested adaptada (Ellis J. y cols., 1997; Stockton J. y cols., 1998) para la subtipificación de la HA de Influenza tipo A/ H3 mediante la amplificación de una región del gen que codifica para la hemaglutinina del virus de la influenza de tipo A / H3.

Se partió de 2 µl del producto de la retrotranscripción al que se le agregó la siguiente mezcla: 5 µl de una solución tampón 10X (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl) (Invitrogen), 1,5 µl de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada cebador AH3 A y AH3 D”, cada uno con concentración de 5 pmoles , 0,4 µl de enzima Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen) y agua destilada estéril para un volumen final de 50 µl. La totalidad de la mezcla se calentó a 94 °C durante 2 minutos y luego a 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, temperatura de fusión 52 °C por 2 minutos y de extensión de 72 °C por 1 minuto. Después de los 35 ciclos se mantiene a 72 °C por 10 minutos.

Con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-PCR, se usaron cebadores Nested para un segundo paso de amplificación. A partir de 2 µl del producto de PCR se le agregó la siguiente mezcla: 5 µl de una solución tampón 10X (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl) (Invitrogen), 1,5 µl de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada cebador AH3B, AH3C” cada uno con concentración de 25 pmoles (tabla 1), 0,4 µl de enzima Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen) y agua destilada estéril para un volumen final de 50 µl. La totalidad de la mezcla se calentó a 94 °C durante 2 minutos y luego a 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, hibridación a 60 °C por 2 minutos y de extensión a 72 °C por 1 minuto. Después de los 35 ciclos se mantiene a 72 °C por 10 minutos.

Se realizó la separación electroforética de los productos de la amplificación (10 µl) en gel de agarosa al 1,2% conteniendo Bromuro de Etidio (1µl/mL) en una solución tampón TBE 1X (0,0089 M Tris borato, 0,002M EDTA, pH 8.0). Se incluyó como marcador de peso molecular un ADN de 100 pares de bases (Gibco BRL). La visualización de las bandas se realizó con luz UV a través de un transiluminador (Pharmacia Biotech).

Los productos amplificados fueron purificados mediante el uso del QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y fueron secuenciados con Big Dye DNA sequencing kit (Perkin Elmer) y analizadas con un secuenciador automático ABI Prism 373 (Perkin Elmer).

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del gen HA del virus de la influenza A/H3.

Nombre oligonucleótido	Secuencia	Tamaño amplicón(pb)
CR AH3A	5'CAGATTGAAGTGACTAATGC3'	883
AH3D''	5'GTTTCTCTGGTACATTCCGC3'	
ested AH3B	5'AGCAAAGCTTTTCAGCAACTG3'	591
AH3C''	5'GCTTCCATTTGGAGTGATGC3'	

pb pares de bases

3.1.7 Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas se alinearon con otras secuencias de la región obtenidas de la base de datos de Los Alamos (www.flulanl.gov). Para el alineamiento se utilizó el programa CLUSTAL W (Thompson y cols, 1994).

Una vez alineadas las secuencias, se usó el programa Modelgenerator (Keane y cols, 2006) para identificar el modelo evolutivo óptimo que mejor describe nuestros datos de secuencias tomando en cuenta los resultados obtenidos. El modelo elegido fue GTR (General Time Reversible) (Guindon y cols, 2005).

Una vez determinado el modelo, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando el programa PhyML (Guindon y cols, 2005). Como medida de la robustez de cada rama de los árboles filogenéticos utilizamos un ensayo de probabilidad aproximado (aLRT), que demuestra que la rama estudiada tiene una probabilidad significativa contra la hipótesis nula que involucra colapsar esa rama del árbol dejando el resto de la topología del árbol idéntica (Anisimova & Gascuel, 2006). El valor de aLRT fue calculado usando el procedimiento SH (Shimodaira-Hasewaga, 2001).

3.1.8 Investigar la presencia de cepas A/H3N2 en la región, resistentes a los antivirales.

Una vez alineadas las secuencias nucleotídicas se tradujeron a secuencias aminoacídicas mediante el uso del programa MEGA 3.0 (Kumar y cols, 2004) con el fin de observar si existen sustituciones de aminoácidos que correspondan a cepas resistentes a los antivirales.

3.2 Determinar el grado de variabilidad genética del gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H1N1 pdm que han circulado durante el año pandémico 2009 en Uruguay y en la región.

3.2.1 Muestras clínicas

Se estudiaron 13 hisopados nasales obtenidos durante los meses de Mayo a Agosto 2009 de individuos con síntomas clínicos de Influenza, disponibles en el Centro Nacional de Referencia de Influenza, MSP, Montevideo, Uruguay.

Los hisopados nasales fueron tomados en población con edades comprendidas entre los 3 y los 60 años, utilizando hisopos culturette® de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se obtuvieron muestras de ambas fosas nasales.

3.2.2 PCR en tiempo real

Con el fin de detectar las muestras positivas para A/H1N1pdm se realizó una PCR en tiempo real (rtRT-PCR) con un kit distribuido por el CDC de Atlanta, EEUU, de acuerdo a las instrucciones dadas por los proveedores (<http://www.who.int/csr/resource/publications/swineflu/realtimepcr/en/index.html>).

3.2.3 Diseño de cebadores

Con la finalidad de tener las secuencias completas de los genes HA y NA, se diseñaron 6 sets de cebadores subtipo específicos que amplifican HA y NA del subtipo A/H1N1 pdm (tabla). Cada set de cebadores se usó a una concentración de 10 pmol/μl.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes HA y NA del virus de la influenza A/H1N1 pdm.

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)
HA	F25	5'CTATATACATTTGCAACCGC3'	1650
	R1675	5'CATATTCTACACTGTAGAGA3'	
	F125	5'CAGTAACACACTCTGTTAAC3'	1434
	R1559	5'CCTTGTTGATTCCAGCTTTC3'	
	F616	5'CAAAGTCTCTATCAGAATGC3'	431
	R1047	5'CTTCAATGAAACCGGCAATG3'	
NA	F20	5'TAATAACCATTGGTTCGGTC3'	1364
	R1384	5'TCAATGGTAAATGGCAACTC3'	
	F108	5'CTCAATTCAACTTGGGAATC3'	1129
	R1237	5'CTTATAACAATCCAGCCCTGT3'	
	F517	5'AGATTTGAGTCAGTCGCTTG3'	401
	R918	5'GATATTCCAGATTCTGGTTG3'	

HA= hemaglutinina, NA= neuraminidasa, pb= pares de bases

3.2.4 Extracción de ARN, amplificación y secuenciación.

El ARN se obtuvo a partir de 140 μl de muestra clínica mediante el uso del kit QIAmp Viral RNA minikit (QUIAGEN, Germany) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. A partir de 5 μl de ARN, se realizó una RT-PCR en un paso usando como enzima SuperScript One-step RT-PCR with platinum Taq (Invitrogen). Para amplificar los genes HA y NA, se

agregaron 5 µl de ARN a una mezcla con un volumen final de 50 µl conteniendo 25 µl de una solución tampón 2X, 1 µl de enzima Superscript (Invitrogen), 1 µl de cada cebador (F25 , R1675 para gen HA y F20, R1384 para gen NA) y 17 µl de agua destilada estéril. La totalidad de la mezcla se calentó a 94 °C durante 2 minutos y luego a 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, hibridación a 51 °C por 1 minuto y de extensión a 72 °C por 2 minutos. Después de los 30 ciclos se mantiene a 72 °C por 5 minutos.

Con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-PCR, se usaron cebadores Nested para un segundo paso de amplificación. A partir de 1 µl del producto de PCR se le agregó la siguiente mezcla: 5 µl de una solución tampón 10X (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl) (Invitrogen), 1,5 µl de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada cebador (F125, R1559 para gen HA y F108, R1237 para gen NA) 0,4 µl de enzima Taq polimerasa 5 U/µl (Invitrogen) y agua destilada estéril para un volumen final de 50 µl. La totalidad de la mezcla se calentó a 94 °C durante 2 minutos y luego a 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, hibridación a 52 °C por 1 minuto y de extensión a 72 °C por 2 minutos. Después de los 30 ciclos se mantiene a 72 °C por 5 minutos.

Se realizó la separación electroforética de los productos de la amplificación (10 µl) en gel de agarosa al 1,2% conteniendo Bromuro de Etidio (1µl/mL) en una solución tampón TBE 1X (0,0089 M Tris borato, 0,002M EDTA, pH 8.0). Se incluyó como marcador de peso molecular un ADN de 100 pares de bases (Gibco BRL). La visualización de las bandas se realizó con luz UV a través de un transiluminador (Pharmacia Biotech).

Los productos amplificados fueron purificados mediante el uso del QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y fueron secuenciados con Big Dye DNA sequencing kit (Perkin Elmer) y analizadas con un secuenciador automático 3730 XL (Perkin Elmer).

3.2.5 Análisis Filogenéticos

Las secuencias del gen HA obtenidas se alinearon con otras secuencias de la región obtenidas de la base de datos de Los Alamos (www.flulanl.gov). Para ello se utilizó el programa MUSCLE (Edgar, 2004).

Una vez alineadas las secuencias se utilizó el programa FINDMODEL (Posada y col, 2001) para identificar el modelo evolutivo que mejor se adapta a nuestros datos de secuencias. El modelo elegido fue HKY + I. Posteriormente se construyó un árbol de máxima verosimilitud utilizando el programa PhyML (Guindon y cols, 2005). Como medida de robustez de cada nodo, se utilizó un ensayo de probabilidad aproximado (aLRT), que demuestra que la rama estudiada tiene una probabilidad significativa contra la hipótesis nula que involucra colapsar esa rama del árbol dejando el resto de la topología del árbol idéntica (Anisimova & Gascuel, 2006). El valor de aLRT fue calculado usando el procedimiento SH (Shimodaira-Hasewaga, 2001).

3.2.6 Mapeo de sustituciones de aminoácidos en la estructura tridimensional del gen de la hemaglutinina.

Recientemente se ha determinado la estructura cristalográfica de la proteína HA de la cepa A/California/04/2009 H1N1pdm. Esta estructura se encuentra depositada en el banco de datos de proteínas (PDB, acceso 3LZG). Con el fin de mapear las sustituciones de aminoácidos en el gen HA de las cepas que circulan en Uruguay y la región se importaron los datos de PDB con el programa PDB Protein Workshop 3.6 (Moreland y cols, 2005).

3.2.7 Ensayos de detección de recombinantes

Las secuencias alineadas fueron testadas para observar si eventos de recombinación ocurrieron en alguna de dichas secuencias. Para ello se usaron dos aproximaciones implementadas en el programa SimPlot (Lole et al., 1999): 1) un análisis de intervalos de ventanas de distancias calculando índices de similaridad; 2) bootscanning (Salminen et al, 1995). Los análisis realizados no mostraron eventos de recombinación entre las secuencias estudiadas.

3.3 Investigar la presencia de cepas A/H1N1pdm resistentes a los antivirales.

Para observar si alguna de las cepas aisladas en Uruguay en el año 2009 era resistente al oseltamivir se realizó la técnica de pirosecuenciación. La misma fue llevada a cabo en el Health Protection Agency (HPA), en la ciudad de Londres, en el marco de un proyecto de implementación de una red de vigilancia virológica entre el Reino Unido y 6 laboratorios de Referencia de Influenza dependientes de la OMS de América del Sur, para el monitoreo de cepas de influenza pandémicas resistentes a drogas antivirales.

Para el estudio se analizaron 96 muestras clínicas (de las cuales 21 son parte de las muestras analizadas para este trabajo de doctorado).

3.3.1 Extracción de ARN, amplificación de una región del gen NA.

El ARN se obtuvo a partir de 150 µl de muestra clínica mediante el uso del kit QIAmp Viral RNA minikit (QIAGEN, Germany) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Para amplificar la región del gen NA que incluye la posición 275, se agregaron 2,5 µl de ARN a una mezcla con un volumen final de 50 µl conteniendo 10 µl de una solución tampón 5X (Qiagen), 2 µl de dNTPS, 2 µl de Qiagen One-Step enzyme mix (Qiagen), 3 µl de cada cebador 10 µM (ver tabla 6) y 27,5 µl de agua destilada estéril. La totalidad de la mezcla se incubó a 50 °C durante 30 minutos, luego a 95 °C por 15 minutos y luego a 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 30 segundos, hibridación a 62 °C por 30 segundos y de extensión a 72 °C por 1 minuto. Después de los 40 ciclos se mantiene a 72 °C por 10 minutos.

Tabla 6. Cebadores usados para la amplificación y pirosecuenciación de una región del gen NA.

Nombre	Secuencia
PanSwH1N1 275F	5'GGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGA3' (5'biotinilado)
PanSwH1N1 275R	5'TAGACGATACTGGACCACAACTG3'
PanSwH1N1 275R secuenciador	5'CAGGAGCATTCTCA3'

3.3.2 Técnica de pirosecuenciación.

El ensayo de pirosecuenciación se llevó a cabo de acuerdo a como lo describen Bright y colaboradores, (Bright y cols, 2006), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Qiagen, Alemania). Brevemente, 20 µl del producto de PCR biotinilado se une con 200 µg de esferas de estreptavidina (Amersham Biosciences), agitando a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Mediante una serie de lavados con etanol, NaOH y solución tampón 1X se lava el templado de simple hebra, para posteriormente hibridizar con el cebador a usar en la secuenciación (tabla 6). La reacción de pirosecuenciación fue llevado a cabo en un PyroMark ID (Qiagen, Alemania).

3.4 Determinar la evolución del tamaño efectivo de las poblaciones virales de A/H1N1pdm a lo largo del tiempo, mediante análisis de coalescencia para los genes de la hemaglutinina y neuraminidasa.

3.4.1 Muestras clínicas

Se estudiaron 35 hisopados nasales obtenidos durante los meses de Mayo a Agosto 2009 de individuos con síntomas clínicos de Influenza, disponibles en el Centro Nacional de Referencia de Influenza, MSP, Montevideo, Uruguay.

Los hisopados nasales fueron tomados en población con edades comprendidas entre los 3 y los 60 años, utilizando hisopos *culturette*® de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se obtuvieron muestras de ambas fosas nasales.

3.4.2 Dinámica de poblaciones de virus de la influenza A/H1N1pdm

Para determinar tanto las tasas de sustitución en poblaciones del virus, así como la dinámica de poblaciones de las cepas que han circulado en Uruguay utilizamos un modelo Bayesiano de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) tal como está implementado en el programa BEAST (Drummond et al., 2005). Es un modelo matemático de sistemas estocásticos donde los estados dependen de probabilidades de transición. El procedimiento consiste en generar cadenas estacionarias de Markov tal es que las transiciones sean entre los posibles valores del (los) parámetro(s) de interés, con los que se obtiene su distribución, a partir de la cual se hallan estadísticos informativos sobre los parámetros. Provee de una estimación que abarca varios parámetros a considerar en un proceso de sustitución que incluyen las tasas generales de evolución molecular y los tiempos (escala que se informa en días) de todos los nodos del árbol filogenético que crea. Los métodos bayesianos que usan un reloj molecular relajado, usan modelos evolutivos flexibles que infieren en el tiempo de los eventos de evolución, de manera que las tasas evolutivas pueden variar entre las ramas de un árbol filogenético. Dentro del MCMC utilizamos diversos modelos tales como: modelo de población constante, crecimiento exponencial de la población, modelo logístico y “Skyline” Bayesiano. Para el estudio de los virus de la influenza, el ancestro más reciente en el tiempo

(TMRCA) provee de una estimación de cuando los genes del virus emergieron en un determinado hospedador. Con las secuencias obtenidas estimamos la historia evolutiva para investigar la posible fecha de introducción del ancestro más reciente para los genes HA y NA de los virus A/H1N1 pdm que circularon en nuestra región. Los resultados obtenidos fueron examinados con el programa TRACER (Drummond y cols, 2006). Los árboles de máxima verosimilitud se construyeron y se visualizaron usando los programas Tree Anotator y FigTree v1.2.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

3.5 Determinar la eficacia de la vacuna seleccionada para el hemisferio sur en el año 2009.

3.5.1 Cálculo de la distancia antigénica

La distancia antigénica entre la cepa vacunal y las cepas que conforman el grupo en el cual se encuentran las cepas de Uruguay y la región fue calculada usando el método de *p-epitope* (Deem y col, 2009). En este método, la distancia antigénica entre dos cepas es calculada de la secuencia aminoacídica en los cinco epítopes de la proteína HA. Para cada epítope, el valor P está definido como la proporción de diferencias aminoacídicas entre dos cepas. El mayor valor P está definido como *p-epítope*, y el correspondiente epítope es definido como el epítope dominante (Deem y col, 2009; Zhou y cols, 2009). Los residuos aminoacídicos se definen de acuerdo a la tabla de Zhou y colaboradores (Zhou y cols, 2009). Los valores P fueron determinados usando el programa MEGA 4 (Tamura y cols, 2007).

4. RESULTADOS

4.1. Determinar el grado de variabilidad genética y antigénica del gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H3N2 que han circulado en 1999-2007 en la población uruguaya.

4.1.1 Variabilidad genética cepas A/H3N2 aisladas en la región

Con el fin de estudiar las relaciones genéticas entre las cepas del virus de la influenza A/H3N2 aisladas en la región y las cepas vacunales incluídas en las vacunas de las temporadas 1999 a 2007 para el hemisferio sur, las secuencias del gen HA de las muestras de Uruguay se alinearon con 68 secuencias correspondientes a cepas A/H3N2 aisladas en otras partes de la región y con las 9 cepas vacunales para los años estudiados.

Los resultados obtenidos se observan en la figura 17. Todas las cepas de influenza A/H3N2 incluídas en el estudio se agruparon en diferentes clados, todos ellos con altos valores de aLRT que confirman los resultados. Se puede observar que diferentes linajes genéticos co-circulan en una temporada en especial en un país en particular, como lo ocurrido en Brasil en el año 2000 (figura 17 abajo). También se puede observar co-circulación en otras partes de la región, como en la temporada 2001, en donde dos linajes genéticos diferentes se pueden observar: uno circuló en Brasil, mientras otro circuló en Argentina, Chile y Brasil (figura 17 arriba y abajo). Las mismas observaciones se pueden ver para la temporada 2004, en donde al menos dos linajes genéticos diferentes circularon: uno en Brasil y Ecuador y otro en Brasil y Uruguay (figura 17 arriba). Interesantemente, la co-circulación de diferentes linajes genéticos en América del Sur no solo se observa en países grandes, como Brasil, también puede observarse en países pequeños como Uruguay, en donde se puede ver co-circulación de linajes en la temporada 2005 (figura 17 medio).

Con respecto a las cepas vacunales de las temporadas 1999 a 2007 recomendadas para el hemisferio sur, se puede observar que sólo la cepa vacunal correspondiente a la temporada 2007 se agrupa en el mismo grupo de cepas aisladas en la región en ese año (figura 17).

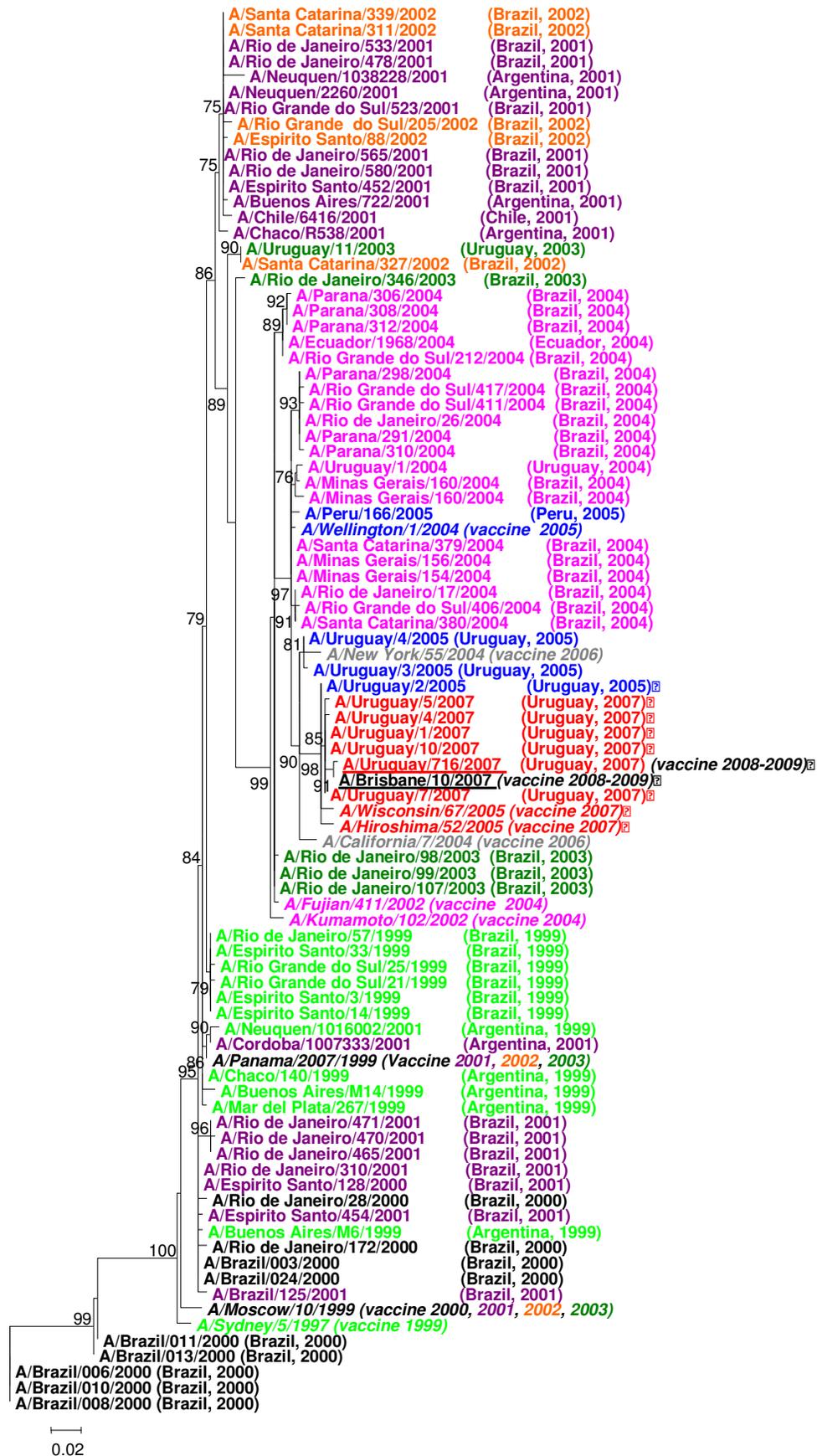


Figura 17. Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina de los virus A/H3N2 que circularon en América del Sur entre 1999-2007. Se muestra un árbol de máxima verosimilitud sin raíz aplicando el modelo GTR. Las cepas en el árbol se muestran con sus nombres, las cuales también muestran la ubicación geográfica y año de aislamiento. El país de procedencia y año de aislamiento se indica a la derecha de cada nombre entre paréntesis. Las cepas vacunales se muestran en itálica.

4.1.2 Determinación del grupo antigénico de cepas A/H3N2 por aislamiento viral

Con el fin de comprender las relaciones antigénicas entre las cepas Uruguayas y las de referencia aisladas en otras partes del mundo, se llevaron a cabo ensayos de Inhibición de la hemoaglutinación a las cepas de virus de la Influenza A/H3N2 aisladas en las temporadas invernales 2003-2007, usando antisueros de referencia suministrados por la OMS.

Tabla 7. Ensayos de IHA de cepas de Influenza A/H3N2 aisladas en Uruguay (2003-2007)*.

Antisueros de Referencia

	SYD/5	MOS/10	PN/2007	KO/770	WY/03	CA/7	NY/55	WI/67	BRIS/10
<i>A/SYDNEY/05/97</i>	320	80	160	80	-	-	-	-	-
<i>A/MOSCOW/10/99</i>	160	320	320	160	-	-	-	-	-
<i>A/PANAMA/2007/99</i>	320	320	640	320	320	-	-	-	-
<i>A/KOREA/770/2002</i>	40	80	80	640	640	-	-	-	-
<i>A/WYOMING/03/2003</i>	-	-	640	1280	1280	320	80	-	-
<i>A/CALIFORNIA/07/2004</i>	-	-	-	-	1280	1280	640	-	-
<i>A/NEW YORK/55/2004</i>	-	-	-	-	640	1280	640	320	-
<i>A/WISCONSIN/67/05</i>	-	-	-	-	-	-	320	1280	-
<i>A/BRISBANE/10/07</i>	-	-	-	-	-	-	-	320	640
A/URUGUAY/11/2003	320	320	1280	320	-	-	-	-	-
A/URUGUAY/01/2004	-	-	160	640	640	-	-	-	-
A/URUGUAY/02/2005	-	-	-	-	640	1280	320	-	-
A/URUGUAY/03/2005	-	-	-	-	160	640	640	-	-
A/URUGUAY/01/2007	-	-	-	-	-	-	160	80	-
A/URUGUAY/04/2007	-	-	-	-	-	-	80	40	-
A/URUGUAY/05/2007	-	-	-	-	-	-	160	80	-
A/URUGUAY/07/2007	-	-	-	-	-	-	80	80	-
A/URUGUAY/10/2007	-	-	-	-	-	-	-	320	640

* Se muestran títulos de Inhibición de Hemaglutinación contra antisueros de referencia. Las columnas con un guión significan que no se realizó el ensayo para las mismas. Los virus de referencia y títulos homólogos se muestran en negrita. Los títulos de cepas de referencia fueron obtenidos del CDC, USA.

Como se puede observar en la tabla 7, no todas las muestras a las que se les realizaron los análisis filogenéticos se les realizaron los análisis antigénicos porque no se obtuvieron los títulos necesarios para la realización de la técnica de la IHA. La única cepa Uruguay aislada en el año 2003 fue antigénicamente similar a A/Panama/2007/1999 (cepa vacunal 2001, 2002 y 2003). La cepa aislada en el año 2004 posee una hemaglutinina antigénicamente similar a cepas A/Korea/770/2002 y A/Wyoming/03/2003, las cuales fueron cepas no utilizadas en las vacunas del hemisferio Sur (A/Fujian/411/2002 fue cepa vacunal 2004 para el hemisferio sur). Las cepas aisladas en el año 2005 son antigénicamente similares a A/California/07/2004 (cepa vacunal 2006). Por último, las cepas aisladas en 2007 son antigénicamente similares a A/Brisbane/10/2007 (cepa vacunal 2008) y A/New York/55/2004 (cepa vacunal 2006).

4.1.3 Investigar la presencia de cepas A/H3N2 en la región, resistentes a los antivirales.

La investigación de la presencia de cepas de la influenza A/H3N2 resistentes a los adamantanos en América del Sur mostró que varias de las secuencias de aminoácidos del gen HA de cepas A/H3N2 de la región presentan características ya reportadas como cepas resistentes a adamantanos (Hata y cols, 2007). Los resultados de este estudio se observan en la tabla 8. Todas las cepas de Uruguay aisladas en la temporada 2007 poseen dos cambios en las secuencias de aminoácidos (S193F y D225N) que presentan todas las cepas resistentes a los adamantanos (tabla 8). Una de las secuencias de Uruguay aisladas en 2005 también posee dichos cambios en el gen HA, no así el resto de las cepas aisladas en esa misma temporada en Uruguay y la región (ver figura 17 y tabla 8).

A/R.G. do Sul/406/2004	SNKSPFSRLNWLHLKPKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTDNDQISLYAQSSGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRFRVRDVP	SRISIIYW
A/R. Janeiro/17/2004	-----	-----
A/Sta. Cat./380/2004	-----	-----
A/Minas Gerais/156/2004	-----	A-----
A/Minas Gerais/160/2004	-----	A-----
A/Parana/308/2004	-----	A-----S-----
A/Parana/312/2004	-----	A-----S-----
A/Ecuador/1968/2004	-----	A-----S-----
A/Uruguay/1/2004	-----	A-R-----
A/Peru/116/2005	-----	-----
A/Uruguay/3/2005	--N-----	A-----I-----
A/Uruguay/4/2005	--N-----	A-----I-----
A/Uruguay/2/2005	--N-----	F-----NI-----
A/Uruguay/716/2007	--N-----	FP-----NI-----
A/Uruguay/7/2007	--N-----	F-----NI-----
A/Uruguay/10/2007	--N-----	F-----NI-----
A/Uruguay/1/2007	--N-----	F-----NI-----
A/Uruguay/4/2007	--N-----	F-----NI-----
A/Uruguay/5/2007	--N-----	F-----NI-----

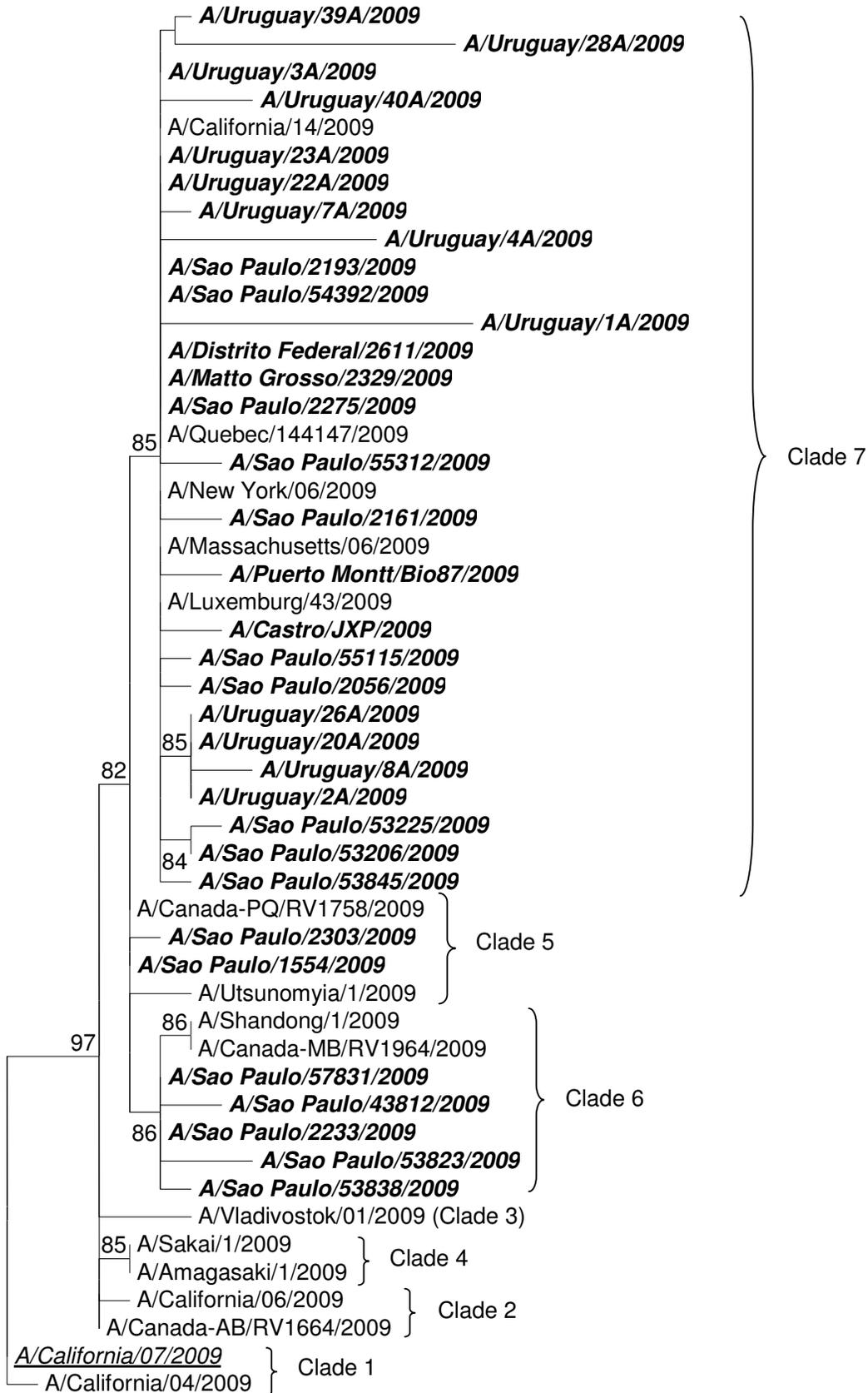
Tabla 8 . Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cepas A/H3N2 aisladas en América del Sur.

Se muestran las cepas por su nombre a la izquierda de la figura. R.G ES Rio Grande, Sta Cat es Santa Catarina. Se muestran las secuencias de aminoácidos de la región HA1 del gen HA en las posiciones 143 a 234. Se muestran en negrita los cambios en las posiciones 193 (S193F) y 225 (D225N) en la proteína HA de cepas resistentes a los adamantanos. Los aminoácidos que no cambian se muestran con un guión.

4.2 Determinar el grado de variabilidad genética de el gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H1N1 pdm que han circulado durante el año pandémico 2009 en Uruguay y en la región.

Con el fin de observar el grado de variación genética de las cepas A/H1N1pdm que circularon en América del Sur, se obtuvieron 13 secuencias del gen HA de muestras que circularon en Uruguay. Las secuencias se alinearon con 21 secuencias de Brasil y Chile y con otras 16 secuencias de otras partes del mundo que representan los diferentes clados definidos recientemente para las cepas pandémicas A/H1N1pdm (Nelson y cols, 2009). Una vez alineadas, se creó el árbol filogenético con el modelo que mejor se adaptó a nuestros datos. Los resultados de este estudio se observan en la figura 18.

Todas las cepas en el árbol se agrupan de acuerdo a un clado respectivo. Las cepas que pertenecen al clado 7 se agrupan juntas; las cepas que pertenecen a otros clados se agrupan por separado (ver figura 18). Interesantemente, las cepas A/H1N1pdm aisladas en América del Sur son asignadas a los clados 5, 6 y 7, revelando así co- circulación de diferentes clados en la región. También se puede observar que ninguna de las cepas aisladas en nuestra región se agrupa con la cepa vacunal (A/California/7/2009) seleccionada para el hemisferio sur para la temporada 2010 (Clado 1).



0.0005

Figura 18. Árbol filogenético para el gen HA de los virus H1N1pdm que circularon en América del Sur. Las cepas de América del Sur se muestran con sus nombres en negrita e itálica. Cepas de otras partes del mundo para las cuales se les ha determinado el clado al que pertenecen se muestran con sus nombres. La asignación de clado se muestra a la derecha del nombre. Los números en las ramas indican los valores aLRT. La barra al final del árbol denota distancia. La cepa vacunal 2010 A/California/07/2009 está subrayada.

Para observar si existen diferencias en cuanto a los aminoácidos que componen las secuencias estudiadas, se procedió a traducir las secuencias nucleotídicas obtenidas a aminoácidos y se compararon entonces con la cepa vacunal A/California/7/2009. Los resultados se observan en la tabla 9. En esta tabla se puede observar que existen sustituciones de aminoácidos que definen clados en todas las cepas A/H1N1pdm aisladas en América del Sur (P100S, S220T y I338V), lo cual también se observa en trabajos anteriores (Nelson y cols, 2009). Dichas sustituciones de aminoácidos pueden observarse tanto en la región HA1 como en la región HA2 de la proteína HA de las cepas de América del Sur (tabla 9).

Todas las cepas de la región poseen D204 en el sitio de unión al receptor, lo cual se sabe confiere la unión del virus A/H1 a los receptores de los humanos (Stevens y cols, 2004), apoyando así una eficiente transmisión de estos virus en humanos.

La mayoría de las cepas de América del Sur poseen D239 en el dominio de unión al receptor (RBD) (tabla 9). Sin embargo, dos cepas de Brasil tienen una sustitución D239G. Esta sustitución fue detectada más frecuentemente en virus aislados de pulmones de pacientes que fallecieron (Potdar y cols, 2010).

El residuo Q310 está muy conservado dentro de las cepas de la región, y no se han observado sustituciones Q310H en las cepas estudiadas. La sustitución Q310H ha sido observada recientemente en una gran cantidad de virus aislados de pacientes que fallecieron y sus casos fueron confirmados como H1N1pdm por laboratorio (Glinsky, 2010).

Las sustituciones en la región HA2 de la proteína HA se han observado en nuestras muestras. Particularmente, G356R ha sido encontrada algunas de las cepas Uruguayas estudiadas (tabla 9).

Strain	Position in HA1											Position in HA2		
	60	100	114	125	179	213	220	239	286	302	338	356	470	502
A/California/7/2009	K	P	D	V	S	D	S	D	D	A	I	G	L	D
A/Sao Paulo/2233/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	F	-
A/Matto Grosso/2329/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Sao Paulo/2193/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Sao Paulo/2161/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	N	S	V	-	-	-
A/Sao Paulo/2275/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Uruguay/8/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	R	-	-
A/Uruguay/3/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	R	-	-
A/DistritoFederal/2611/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Castro/JXP/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Uruguay/4/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	Y
A/Uruguay/38/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/PuertoMontt/Bio87/2009	-	S	-	-	R	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Uruguay/40/2009	I	S	-	M	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Uruguay/39/2009	-	S	-	-	-	D	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Uruguay/19/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	R	-	-
A/Uruguay/35/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Sao Paulo/53206/2009	-	S	-	-	-	-	T	G	-	-	V	-	-	-
A/Sao Paulo/53225/2009	-	S	-	-	-	-	T	G	-	-	V	-	-	-
A/Sao Paulo/54392/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Sao Paulo/53845/2009	-	S	-	-	-	-	T	N	-	-	V	-	-	-
A/Uruguay/6/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	R	-	-
A/Sao Paulo/55115/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Sao Paulo/55312/2009	-	S	N	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-
A/Uruguay/11/2009	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	V	-	-	-

Tabla 9. Sustituciones de aminoácidos en virus A/H1N1pdm aislados en América del Sur respecto a la cepa vacunal utilizada para el hemisferio Sur. A/California/07/2009 es la cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur para el año 2010. Los aminoácidos que permanecen iguales a la cepa vacunal se indican con un guión.

4.2.2 Mapeo de sustituciones de aminoácidos en estructura tridimensional del gen de la hemaglutinina.

El sistema inmune humano responde primariamente a cinco regiones (epítopes) de la proteína HA (Bush y cols, 1999). Estudios primarios en la identificación de los epítopes de A/H1 se llevaron a cabo por mapeo de anticuerpos con la cepa A/PR/8/1934 (H1), además de estudios adicionales de mutaciones de laboratorio (Caton y cols, 1982). Estudios recientes han revelado una definición completa de los epítopes de las cepas A/H1 presentes en los virus A/H1N1pdm, designados de la A a la E (Deen y col, 2009). Recientemente se ha determinado la estructura cristalina de la cepa A/California/04/2004 (H1N1pdm), la cual pertenece al clado 1 (Xu y cols, 2010). Esta cepa es muy parecida a la cepa vacunal A/California/7/2009.

Con el fin de mapear las sustituciones aminoacídicas encontradas en las cepas de Uruguay y la región A/H1N1pdm, usamos la estructura (PDB numero acceso 3LZG) para ver posibles cambios en las 5 regiones antigénicamente conocidas. Pudimos observar que las sustituciones P100S y S220T, que se encontraron en todas las cepas de América del Sur estudiadas, son asignadas a los epítopes E y D, respectivamente (figura 19). La sustitución D239G, encontrada en algunas cepas de Brasil y que se asocian a una alta mortalidad, son asignadas al epítipo D. Por último, la sustitución I338V se encuentra situada por fuera de los 5 epítipes de la HA, a pesar de que se encuentra cerca de la región del epítipo C (figura 19).

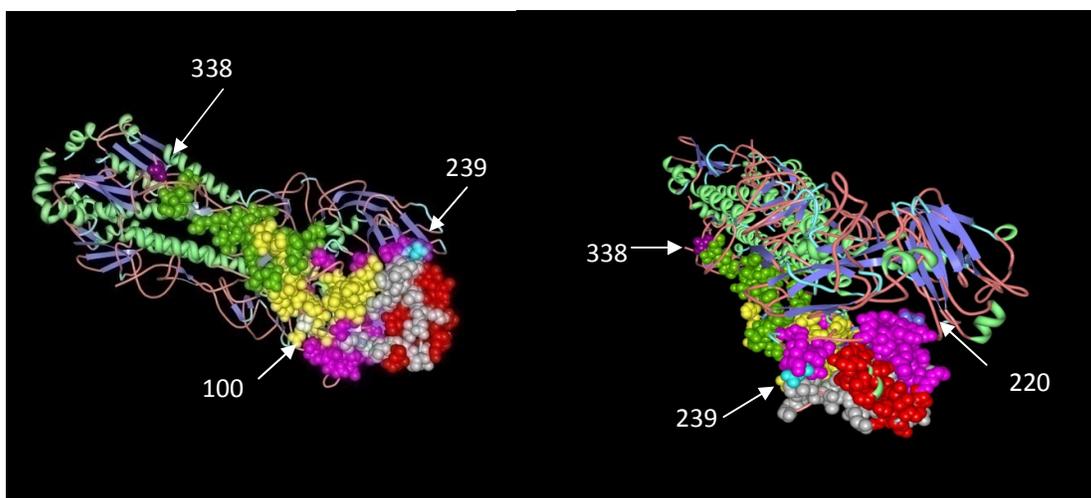


Figura 19. Modelo 3D de la hemaglutinina de la cepa H1N1pdm A/California/04/2009. Se muestra el modelo de la molécula HA (PDB número de acceso 3LZG). Las moléculas se colorearon de acuerdo al tipo de conformación (vueltas en celeste, colas en rojo, hélices en verde, hojas beta en azul). Los epítipes de HA A-E se muestran en gris, rojo, verde, magenta y amarillo respectivamente de acuerdo a Zhou y cols, 2009. Las sustituciones P100S, S220T, D239G y I338V se muestran en blanco, azul, celeste y violeta respectivamente, y sus posiciones se indican con flechas. Se muestran 2 vistas de la molécula.

4.3 Investigar la presencia de cepas A/H1N1pdm resistentes a los antivirales.

Los resultados obtenidos para las 21 muestras de Uruguay analizadas con el pirosecuenciador muestran que todas son cepas A/H1N1pdm sensibles al oseltamivir. En la figura 19 se muestra el pirograma de una muestra sensible al oseltamivir.

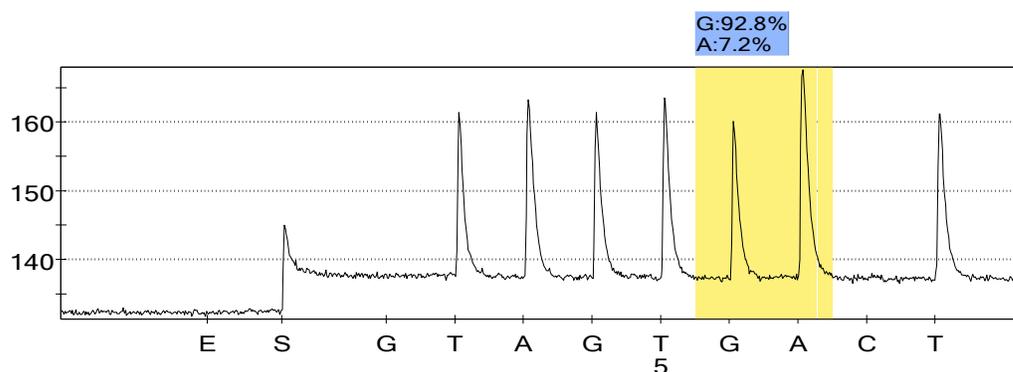


Figura 19. Pirograma generado por el aparato de PyroMark ID. En la figura se observa la región de interés que comprende la posición 275 del gen de la NA la cual confiere resistencia al oseltamivir. Se pueden observar los picos que corresponden a las bases TAGT**G**AT lo que corresponde a cepas sensibles al oseltamivir. Las cepas que son resistentes al oseltamivir tienen el cambio TAGT**A**AT.

4.4 Determinar la evolución del tamaño efectivo de las poblaciones virales de A/H1N1pdm a lo largo del tiempo, mediante análisis de coalescencia para los genes de la hemaglutinina y neuraminidasa.

4.4.1 Construcción de árboles de máxima verosimilitud

Se obtuvieron 13 secuencias para el gen HA y 35 para el gen NA las cuales se alinearon con otras secuencias de los genes HA y NA de la región (Argentina, Brasil y Chile) obtenidas de la base de datos de Los Alamos (www.flulanl.gov). Para el alineamiento se utilizó el programa CLUSTAL W (Thompson y cols, 1994).

Una vez alineadas las secuencias, se usó el programa Modelgenerator (Keane y cols, 2006) para identificar el modelo evolutivo óptimo que mejor describe nuestros datos de secuencias tomando en cuenta los resultados obtenidos. Se crearon los árboles filogenéticos usando el método de máxima verosimilitud usando el modelo GTR (Guindon y cols, 2005). Los resultados obtenidos para el gen HA y NA se muestran en las figuras 21 y 22 respectivamente.

El análisis para el gen HA de las cepas de Uruguay, aisladas mayoritariamente en Julio 2009, muestra que las mismas se agrupan con cepas tanto con cepas de Brasil como de Argentina, todas pertenecientes al clado 7, sugiriendo una convergencia evolutiva o exportación de virus de la región. Se puede observar también una rápida difusión espacial de las cepas de América del Sur. Dicha mezcla espacial es típica de los virus de la influenza A y sugiere que las cepas A/H1N1pdm exhiben una dinámica espacial similar a los virus de la influenza estacionales (Rambaut y cols, 2008; Nelson y cols, 2007).

Los análisis para el gen NA de las cepas de Uruguay muestran que sería una secuencia consenso principal la que domina en el paisaje viral desde el inicio hasta el fin de la pandemia.

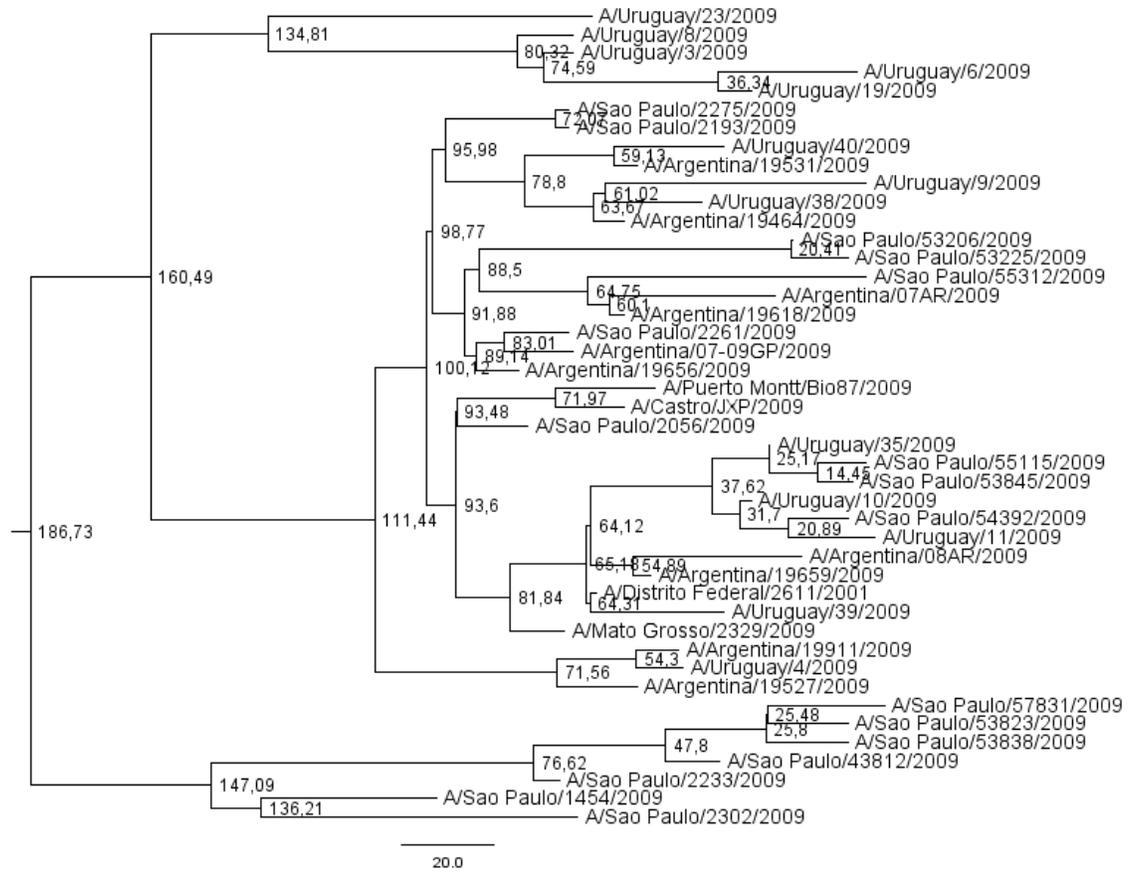


Figura 21. Arbol filogenético obtenido por análisis bayesianos con MCMC de 44 secuencias del gen HA de cepas A/H1N1pdm 2009. Se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud usando el modelo GTR, un reloj relajado y el modelo de población expansional. Las cepas del árbol se muestran con sus nombres. La edad de los nodos se muestra en días en cada nodo del árbol.

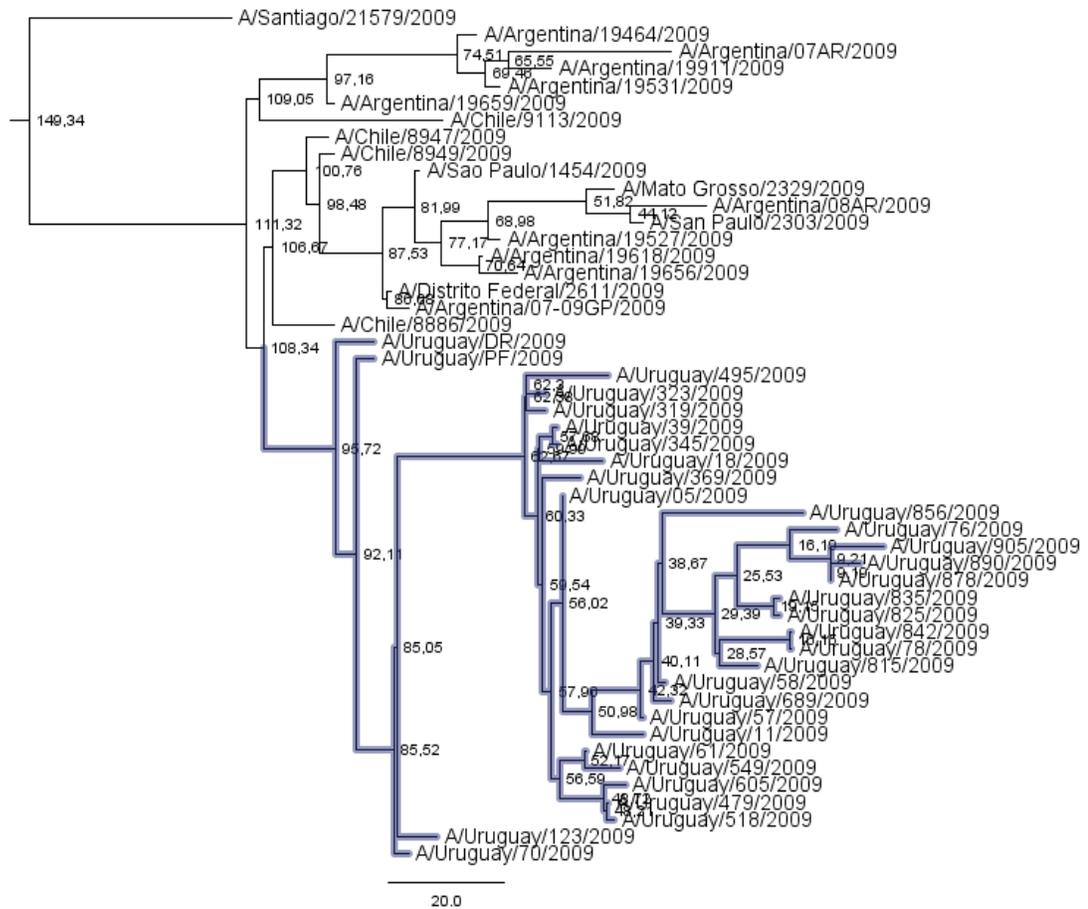


Figura 22. Arbol filogenético obtenido por análisis bayesianos con MCMC de 49 secuencias del gen NA de cepas A/H1N1pdm 2009. Se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud usando el modelo GTR, un reloj relajado y el modelo de población expansional. Las cepas del árbol se muestran con sus nombres. La edad de los nodos se muestra en días en cada nodo del árbol.

4.4.2 Dinámica de poblaciones de virus de la influenza A/H1N1pdm

Con el fin de conocer las tasas de evolución y el modo de evolución de los virus A/H1N1pdm que circularon en el año 2009, se testearon diferentes modelos dinámicos de población siendo el de crecimiento de población expansional el que mejor se adaptaba a nuestros datos de secuencias. Este resultado fue corroborado con los valores obtenidos de probabilidades marginales así como de los tamaños efectivos de la muestra (ESS) del modelo seleccionado. Los resultados que se muestran en la tabla 10 son el resultado del modelo CMMC seleccionado, usando el modelo GTR, un reloj molecular relajado (Drummond y cols, 2006) y el modelo de crecimiento expansional de la población (Drummond y cols, 2005).

Como se puede observar en la tabla 9, la tasa de sustitución de nucleótidos por sitio por año es de 5.65×10^{-3} para el gen HA, mientras que la tasa de sustituciones de nucleótidos por sitio por año para el gen NA es de 4.67×10^{-3} . Estas tasas son significativamente más altas que las previamente estimadas al inicio de la pandemia A/H1N1pdm (3.67×10^{-3}) (Fraser y cols, 2009; Smith y cols, 2009).

Respecto a los ancestros comunes más recientes para el gen HA y NA las cepas de América del Sur se pueden ver los resultados obtenidos en la tabla 10. Las cepas de América del Sur estudiadas han evolucionado de ancestros que existían ya por el 25 de Setiembre de 2008 para el gen HA y 14 de Diciembre de 2008 para el gen NA. Estos resultados pueden ser comparables a estudios previos que muestran que el origen de la pandemia 2009 tendrían al ancestro más común (MRCA) el 28 de Agosto de 2008 para el gen HA (Smith y cols, 2009) y 17 de Agosto 2008 para el gen NA (Goñi y cols, 2009).

Tabla 10. Bayesian coalescent inference de cepas A/H1N1pdm aisladas en América del Sur.

Grupo	Parametro	Valor ^b	HPD ^c	ESS ^d
Gen HA	Log probabilidad	-2280.83	-2271.76 to -2290.18	4058.93
	Posterior	-2583.26	-2544.75 to -2628.14	434.62
	Anterior	-302.42	-263.17 to -344.24	410.56
	tasa media ^e	5.65×10^{-3}	1.71×10^{-3} to 9.89×10^{-3}	535.30
	Edad raiz (Dias)	319.16	106.61 to 701.21	774.17
	MRCA ^f	25/09/2008		
Gen NA	Log probabilidad	-1579.70	-1572.11 to -1587.45	5029.02
	Posterior	-1866.64	-1821.33 to -1914.57	516.31
	Anterior	-286.94	-242.65 to -336.48	509.07
	Tasa media	4.67×10^{-3}	8.39×10^{-3} to 1.43×10^{-3}	912.23
	Edad raiz (Dias)	252.86	127.80 to 461.14	889.22
	MRCA	14/12/2008		

^b en todos los casos se muestra el valor principal. ^c HPD, high probability density values.

^d ESS, tamaño efectivo de la muestra. ^e tasa media fue calculada en sustituciones/sitio/día y convertidas a sustituciones/sitio/año. ^f MRCA, día del ancestro más reciente.

4.5 Determinar la eficacia de la vacuna seleccionada para el hemisferio sur en el año 2009.

La vacunación es una manera efectiva de reducir la morbilidad y mortalidad por el virus de la influenza. La eficacia de las vacunas varía año a año, en parte debido a las diferentes distancias antigénicas entre las cepas circulantes y la cepa vacunal. El epítoto dominante se define al epítoto que tiene mayor cantidad de mutaciones, ya que dicho epítoto está influenciado por la presión selectiva del sistema inmune. Si consideramos solamente las sustituciones que ocurren en el epítoto dominante, la teoría del *p epitope* provee una predicción de la eficacia de la vacuna que se correlacionaría con los estudios epidemiológicos de eficacia de vacunas en humanos. La eficacia de la vacuna tiene una correlación lineal con la distancia antigénica entre la cepa vacunal y la cepa circulante (Gupta y cols, 2006; Smith y cols, 2004). La medida de *p epitope* para la distancia antigénica puede ser utilizada para estimar la eficacia de la vacuna, la cual puede ser estimada por la ecuación $E = 0.47 - 2.47 \times p \text{ epitope}$, donde E es la eficacia de la vacuna. Esta ecuación también predice que la eficacia de la vacuna no es positiva para valores de *p epitope* > 0.19 (Smith y cols, 2004; Zhou y cols, 2009).

Con los datos de nuestras secuencias calculamos la distancia antigénica entre la cepa vacunal para el hemisferio sur en la temporada 2009 A/California/7/2009 (H1N1) y una cepa de Uruguay que pertenece al clado 7 en donde se encuentran todas las cepas de Uruguay en el árbol filogenético (A/Uruguay/38/2009). Mediante el uso del método de *p epitope*, encontramos que el mayor valor de *p epitope* fue 0.059 (epitoto dominante E), lo cual sugiere que la eficacia de la vacuna seleccionada para las cepas de Uruguay que se agrupan en el clado 7 es del 68.9%.

5. DISCUSION

5.1 Determinar el grado de variabilidad genética y antigénica del gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H3N2 que han circulado en 1999-2007 en la población uruguaya.

Los resultados de este estudio indican que múltiples clados co-circulan durante la mayoría de las temporadas invernales por el virus de la influenza en América del Sur (figura 17). Los resultados también concuerdan con estudios recientes realizados por Nelson y cols, 2007 en Australia y Nueva Zelanda.

A pesar de que algunas de las cepas aisladas en la región pueden estar relacionadas a múltiples temporadas invernales (figura 17, abajo), sugiriendo que no se pueda afirmar sin más estudios que la evolución en el lugar no ocurre en algunas temporadas, los virus estudiados parecen no haber evolucionado de manera regular en nuestra región (por ejemplo las cepas de Brasil aisladas durante 2000-2004 en la figura 17). La evolución parece ocurrir por la re-introducción de nuevas cepas en la región. Esto concuerda con estudios recientes que evidenciaron la migración del virus entre hemisferios entre temporadas, aún en lugares separados geográficamente (Nelson y cols, 2007; Viboud y cols, 2006). Trabajos realizados por Russell y cols, 2008 mostraron la continua circulación de los virus de la influenza A en el este y sudeste de Asia en donde las epidemias se solapan durante una misma temporada. Las nuevas cepas migran primeramente hacia Oceanía, Norteamérica y Europa para llegar por último a América del Sur.

Para la mayoría de las temporadas invernales estudiadas, las cepas vacunales y las cepas que circularon se asignaron en diferentes clados (figura 17). Esto indicaría que para la mayoría de las temporadas estudiadas, las cepas vacunales y las cepas que han circulado poseen relaciones genéticas distantes entre ellas. Los resultados obtenidos hablan de la necesidad de realizar estudios más profundos de las cepas de virus de la influenza A que circulan en la región, así como de las rutas y los mecanismos de dispersión del virus.

Aunque los ensayos serológicos como la inhibición de la hemaglutinación, son esenciales para el monitoreo rápido de los cambios antigénicos en la HA de las nuevas cepas, la información puede ser malinterpretada si se utiliza para estudios evolutivos entre virus. El sistema inmune del hospedador ve el fenotipo viral y no el genotipo. Como ejemplo, virus que evolucionan en linajes diferentes parecen ser antigénicamente similares ya que comparten un sitio antigénico clave. Esta es la razón por la cual los análisis antigénicos deben ser realizados junto con la secuenciación del gen con más cambios antigénicos como por ejemplo la región HA1 del gen HA. De esta forma se pueden identificar los residuos aminoacídicos asociados con la deriva antigénica, lo cual ayudará a establecer patrones evolutivos más precisos entre virus. Por lo general, los resultados obtenidos de la IHA no se comparan de manera rutinaria con la información filogenética. Está claro que ambos análisis (antigénicos y filogenéticos) se beneficiarían exitosamente de cada uno (Holmes y col, 2009).

A pesar de que el aislamiento viral se considera una técnica “estándar” para el estudio de los virus de la influenza, los resultados obtenidos en la tabla 7 y en la figura 17 muestran la necesidad de realizar ambos estudios (genéticos y antigénicos) de manera de poder ayudar a comprender un poco más cómo evolucionan los virus de la influenza.

Los resultados obtenidos en la tabla 7 muestran el desfase que existe entre las cepas circulantes de cada año y las respectivas cepas vacunales utilizadas en dichos años. La única excepción está en las cepas aisladas en el año 2007, las cuales parecen tener resultados antigénicos y genéticos similares (tabla 7 y figura 17).

Debido a que el proceso de manufactura de la vacuna no lleva menos de 6 meses, es frecuente que halla un desfase entre la cepa circulante de la próxima temporada invernal y la cepa vacunal. Esto sugiere que si la cepa candidata a ser parte de la vacuna no es seleccionada de manera correcta de una cepa representativa de las cepas circulantes, será de gran problema para la prevención de una infección por virus de la influenza A/H3N2. Como ejemplo, en el hemisferio sur en un período de 9 años (1999-2007) se ha cambiado el componente A/H3N2 de la vacuna 8 veces. La similitud genética entre las cepas circulantes y la cepa vacunal para cada temporada y la tendencia de tener sustituciones de aminoácidos posiblemente esté relacionado con la variación antigénica por mutaciones génicas lo cual es importante para la obtención de nuevos hallazgos basados en las características de los aminoácidos y las sustituciones en el gen HA, siendo esto de gran ayuda para la predicción de

la emergencia de nuevas variantes antigénicas en los virus de la influenza junto con una vigilancia anual del virus y una investigación epidemiológica.

La introducción de la cepa A/Fujian/411/2002 en 2002-2003 ha traído sustituciones de aminoácidos en sitios que influyen la capacidad para el crecimiento en huevos embrionados (Medeiros y cols, 2001). Los aminoácidos 193 y 225 son algunos de los cambios que se encuentran involucrados en los sitios de unión al receptor en la HA, por lo tanto los cambios observados en estos sitios influenciarían la unión al receptor. El cambio S193F se encuentra en el epítotope B del gen HA. Este epítotope se encuentra cerca del sitio de unión al receptor, jugando un rol importante para evadir a los anticuerpos neutralizantes. El otro cambio D225N se encuentra en el epítotope D del gen HA (Huang y col, 2011).

Todas las cepas aisladas en Uruguay durante la temporada 2007 poseen 2 cambios de aminoácidos característicos de las cepas resistentes a los adamantanos (tabla 8). Debido a que no es muy frecuente el uso de este tipo de antivirales en la región, y que todas las cepas resistentes pertenecen a un mismo linaje genético (Simonsen y cols, 2007), y que es muy improbable que estos cambios surjan por casualidad en las cepas que circulan en América del Sur, este polimorfismo en particular nos hace pensar en una posible migración de estas cepas resistentes a la región sudamericana.

Los resultados de estos estudios sugieren que los virus resistentes a los adamantanos, primeramente detectados en Japón en 2004-2005 (Hata y cols, 2007), y luego diseminados al sudeste de Asia, Oceanía y Norteamérica durante las temporadas 2005-2006 (Bright y cols, 2006; Simonsen y cols, 2007), llegaron a América del Sur en la temporada invernal 2005. Esto concuerda con la teoría de la migración viral entre hemisferios y apoya las evidencias recientes que las cepas que emergen en el sudeste de Asia finalmente llegan a América del Sur (Russell y cols, 2008).

Aún así, no todas las cepas de América del Sur aisladas en la temporada 2005 tienen el mismo origen; cepas aisladas de Perú y Uruguay no son resistentes a los adamantanos (ver figura 17 y tabla 8). Esto habla de la posibilidad de la co-circulación de virus de por lo menos 2 orígenes diferentes. Los resultados de este estudio revelan como la migración viral juega un

rol importante en la historia epidemiológica de los virus de la influenza A que circulan en América del Sur. También resaltan la importancia de realizar una vigilancia del virus en la región sudamericana, de manera de elucidar los movimientos geográficos y la evolución dentro de la región. Esto sería especialmente importante en las zonas tropicales de nuestro continente, teniendo en cuenta que las zonas tropicales son zonas de reservorio del virus, de donde emergen las nuevas cepas (Rambaut y cols, 2008).

5.2 Determinar el grado de variabilidad genética del gen de la hemaglutinina de los virus de la influenza A/H1N1 pdm que han circulado en el año pandémico 2009 en Uruguay y en la región.

La variabilidad antigénica de los virus de la influenza A es la base de las epidemias recurrentes que ocurren cada año (de Jong y cols, 2000). Por esta razón, los esfuerzos para la caracterización de las variantes epidémicas son de gran importancia a la hora de la formulación de la vacuna para la próxima temporada invernal, dado que la efectividad de la vacuna dependerá de cuán similares sean la cepa vacunal y la cepa circulante (Nelson y cols, 2008). La determinación de la diversidad global de las cepas H1N1pdm es de gran importancia para poder entender la evolución y la dispersión de la pandemia, y de predecir el impacto futuro en las poblaciones humanas (Nelson y cols, 2009).

Los análisis filogenéticos realizados usando secuencias del gen de la HA revelaron la presencia de 7 linajes genéticamente diferentes (clados 1-7) en las cepas A/H1N1pdm, en acuerdo con otros trabajos los cuales utilizaron genomas completos concatenados (Nelson y cols, 2009). Todas las cepas aisladas en Uruguay, así como la mayoría de cepas aisladas en la región, son asignadas al clado 7 (figura 18). Lo mismo ocurre en otras partes del mundo en donde el clado 7 fue el clado mayoritariamente detectado (Nelson y cols, 2009; Potdar y cols, 2010). La co-circulación de diferentes clados (5, 6 y 7) se ha observado en Brasil. En el presente, aún no está claro si estas diferencias son debidas a la severidad clínica de cada caso o a la capacidad replicativa entre los linajes co-circulantes (Nelson y cols, 2009).

Las sustituciones aminoacídicas en la proteína HA que definen el clado 7 (P100S, S220T y I338V) se encontraron en todas las cepas sudamericanas (tabla 8). Ninguna de estas sustituciones se encuentra presente en la cepa vacunal A/California/7/2009, la cual pertenece al clado 1. Durante la finalización de este trabajo, 63 nuevas secuencias del gen HA aisladas en la región eran depositadas en el banco de datos de influenza. La mayoría de ellas tienen las mismas sustituciones aminoacídicas que definen al clado 7.

Los resultados obtenidos revelan que las cepas A/H1N1pdm que han dominado la región pertenecen al clado 7, a pesar de que cepas de los clados 5 y 6 han co-circulado en la región. Aún queda por saber si esa predominancia se debe a una mejor capacidad replicativa del virus o se debe a una mejor transmisión del virus a humanos. Más estudios son necesarios para comprender la eficacia de la cepa vacunal del clado 1 contra cepas que pertenecen al clado 7 (y otros clados) que circulan en la región, así como en otras partes del mundo. Esta información será invaluable al momento de la formulación de la vacuna para el virus de la influenza.

5.3 Investigar la presencia de cepas A/H1N1pdm resistentes a los antivirales.

La vigilancia en la aparición de cepas de virus de la influenza resistentes a los INAs es de gran importancia tanto para la vigilancia global de las cepas circulantes como para el tratamiento individual de los pacientes. Las metodologías basadas en el cultivo del virus para la detección de virus resistentes llevan su tiempo y tienen poca sensibilidad para la detección de mutaciones en quasiespecies virales. El desarrollo del ensayo de pirosecuenciación provee de una herramienta rápida para una detección temprana de cepas resistentes y permite el análisis de cambios en regiones específicas del gen de la NA, el cual posee la habilidad para alterar la susceptibilidad del virus a los INAs en humanos. El blanco del ensayo, en nuestro caso, fue la región del gen de la NA que contiene la posición 275. Cambios de aminoácidos en esta posición confieren resistencia al oseltamivir. La cuantificación se lleva a cabo a partir de ARN viral extraído directamente de muestras clínicas, reduciendo las posibilidades de generación de variantes antigénicas debido a la selección en cultivos celulares (Lackemby y cols, 2008b).

Es importante un continuo monitoreo de los antivirales utilizados, de manera de mantener un uso adecuado de los mismos para tener un buen manejo durante las infecciones por virus influenza estacional o de brotes. Ese trabajo permitirá a los laboratorios encargados, tener los métodos disponibles para prepararse frente a una futura pandemia.

La colaboración entre laboratorios que realicen esta vigilancia promoverá la armonización de los ensayos de detección de resistencia, refinará los criterios y llevará a cabo una buena interpretación de los datos obtenidos en los ensayos de susceptibilidad. Estudios epidemiológicos y virológicos también son necesarios para poder así elucidar que lleva a la aparición de cepas resistentes y su dispersión en humanos.

5.4 Determinar la evolución del tamaño efectivo de las poblaciones virales de virus de la influenza A/ H1N1pdm a lo largo del tiempo, mediante análisis de coalescencia para los genes de la hemaglutinina y neuraminidasa.

La aplicación de los ensayos que utilizan la teoría de coalescencia para el análisis de las secuencias genómicas obtenidas proveen de una herramienta importante para aumentar los conocimientos de la dinámica de transmisión de los virus de la influenza. En particular, la coalescencia permite que las características demográficas de las poblaciones virales (particularmente el tamaño de la población y la tasa de crecimiento) infieran directamente de los datos de las secuencias obtenidas. Los análisis de coalescencia son especialmente útiles para el caso de los virus ARN, debido a que su rápida evolución significa que la dinámica temporal y espacial son discernibles a lo largo del período estudiado y pueden en teoría ser combinados datos epidemiológicos.

Nuestras estimaciones sugieren que el gen HA de los virus A/H1N1pdm que circularon en América del Sur en 2009 evolucionaron de ancestros que ya existían a fines de Setiembre 2008 (25 de Setiembre) (tabla 10). Estos datos son similares a las primeras estimaciones realizadas por Smith y colaboradores (Smith y cols, 2009) en donde publican que el ancestro más reciente (MRCA) de las cepas A/H1N1pdm surge por el 28 de Agosto 2008. Los resultados sugieren que el gen HA de estos virus estaba circulando en los porcinos mucho antes de la aparición en humanos (Garten y cols, 2009). Estudios recientes han revelado que hubo un período de aproximadamente 3 meses antes de Abril de 2009 en donde el virus circuló en humanos antes de comenzar a transmitirse de manera continua (Rambaut et al, 2009). Las estimaciones del ancestro más reciente de los virus A/H1N1pdm 2009 ocurre entre fines de Enero y principios de Marzo 2009 (Nelson y cols, 2009). Los resultados muestran que el proceso de reordenamiento del gen HA en los reservorios de porcinos en Julio-Agosto 2008 pudieron emerger algunos meses más tarde, por enero-marzo 2009, en la población humana. Esto habla de la importancia en el cuidado de la caracterización del gen HA de cepas que circulan en los reservorios del virus.

Las primeras estimaciones de las tasas evolutivas para el gen HA para las cepas A/H1N1pdm del 2009 establecieron tasas de 3.67×10^{-3} sustituciones/sitio/año (Smith y cols, 2009). En nuestro estudio se obtuvieron tasas de 5.65×10^{-3} sustituciones/sitio/año para las cepas que circularon en Uruguay y la región (Tabla 10). Una posible diferencia entre las 2 estimaciones puede ser debido al hecho que las primeras estimaciones se hicieron al inicio de la pandemia, con secuencias aisladas entre Marzo - Mayo 2009, mientras que nuestras estimaciones se llevaron a cabo con secuencias aisladas entre Mayo - Agosto 2009. Para el gen NA se obtuvieron tasas levemente menores (4.67×10^{-3} sustituciones/sitio/año).

Los árboles de máxima verosimilitud que se obtuvieron revelaron una difusión espacial rápida de las cepas de América del Sur, con múltiples entradas del gen HA (figura 21). Es importante destacar que múltiples linajes co-circulan en una única y pequeña región como lo es Uruguay. Esto podría conducir a reordenamientos intra-subtipo, como fue recientemente sugerido por Rambaut y colaboradores (Rambaut y cols, 2008).

Al contrario, para el gen NA (figura 22), podemos observar que prácticamente todas las cepas de Uruguay se agrupan en un único clado, mostrando así que las secuencias para el gen NA al momento de aparecer en nuestro país ya se encontraban más conservadas respecto a las secuencias del gen HA.

5.5 Determinar la eficacia de la vacuna seleccionada para el hemisferio sur en el año 2009.

El cálculo de la distancia antigénica entre la cepa vacunal y una cepa representativa de las cepas de América del Sur perteneciente al clado 7 (A/Uruguay/38/2009) con las sustituciones aminoacídicas P100S, S200T y I338V, revelaron que el mayor valor de *p* *epítape* sea de 0.059 (epítape dominante E). Esto sugiere que en el peor de los casos la eficacia de la vacuna contra estas cepas del clado 7 es del 68.9%. A pesar de que estudios preliminares de la eficacia de la vacuna, llevados a cabo en Alemania, revelaron excelentes eficacias de la vacuna monovalente con la cepa vacunal A/California/7/2009 en personas entre 14 a 59 años, y una eficacia moderada en adultos mayores a 60 años (Wichmann y cols, 2010), los resultados obtenidos usando la teoría de *p* *epítape* revela que más estudios son necesarios para poder ver la eficacia de la vacuna con una cepa vacunal de clado 1 contra cepas de clado 7. Además, y de gran importancia clínica, más estudios son necesarios para poder comprender las reglas por las cuales la evolución antigénica ocurre en los virus de la influenza A (Nelson y cols, 2007) (por ejemplo cómo se mueve el virus de un tipo antigénico a otro). Esto contribuirá con la posibilidad del diseño de vacunas más efectivas (Caton y cols, 1982). Nuevos estudios filogenéticos con una medida asociada a la antigenicidad viral ayudará a dilucidar sobre estos problemas (Holmes, 2009).

6. CONCLUSIONES

- ✓ En este trabajo de tesis, para la mayoría de las temporadas invernales estudiadas, las cepas vacunales y las cepas de virus de la influenza A que circularon se asignaron en diferentes clados. Esto indicaría que para la mayoría de las temporadas estudiadas, las cepas vacunales y las cepas que han circulado poseen relaciones genéticas distantes entre ellas. Los resultados obtenidos hablan de la necesidad de realizar estudios más profundos de las cepas de virus de la influenza A que circulan en la región, así como de las rutas y los mecanismos de dispersión del virus.
- ✓ La sociedad actual que posee mayores recursos sanitarios, sin embargo por su complejidad, es más vulnerable a las graves epidemias de gripe que pueden paralizar o trastornar de forma importante su normal funcionamiento. Ante ello la única estrategia es la vigilancia epidemiológica del virus de la influenza humano y animal, que permita disponer de una información contrastada, fiable, asequible y en tiempo real. Sólo así la población, el personal de la salud y los pacientes podrán hacer uso racional y lógico de los recursos a su alcance y los responsables de la salud podrán anticipar de forma sensata sus decisiones.
- ✓ El entendimiento de las bases evolutivas para la proliferación de virus resistentes a los antivirales es importante para poder desarrollar estrategias efectivas para la administración de las drogas antivirales en una pandemia, pero también necesitará disponibilidad pública de otras secuencias del genoma del virus.
- ✓ Como los eventos recientes de 2009 lo sugieren, la generación de nuevos virus por reordenamiento entre cepas de origen porcino con cepas humanas o de otros animales es inevitable. En este contexto, la posibilidad de que una nueva cepa cause una epidemia o pandemia en poblaciones inmunológicamente susceptibles es el mayor desafío para la

salud de la población. Consecuentemente, durante períodos interpandémicos, todas las infecciones humanas por virus de la influenza de origen animal, aún aquellas que parecen clínicamente leves, necesitan de un buen estudio para poder comprender los posibles riesgos clínicos en la población.

- ✓ Además de una vigilancia internacional de las cepas de virus influenza que circulan anualmente, un mejor entendimiento en la variación y evolución de los virus de la influenza es de gran importancia para asegurar que los virus candidatos a ser utilizados como cepas vacunales sean lo más parecido posible a las cepas circulantes.

Si una nueva variante antigénica es detectada y pareciera ser la futura cepa predominante, es recomendable entonces la actualización de la cepa vacunal. El “predecir y producir” resulta en una buena eficiencia vacunal la cual minimizará la mortalidad y morbilidad de futuras epidemias. La recomendación debe realizarse un año antes de que la próxima temporada invernal comience debido al tiempo requerido para producir y distribuir la vacuna. Los problemas surgen cuando una nueva variante no se identifica de manera temprana de manera de poder reformular la composición de la vacuna. Es por eso destacar lo importante que resulta un estudio detallado de la evolución y la epidemiología del virus, lo cual resulta en la temprana identificación de nuevas variantes.

- ✓ La mejora en los métodos bioinformáticos y los análisis epidemiológicos, así como una base de datos con más secuencias del genoma de los virus de la influenza, proveen de una oportunidad sin precedentes para la investigación de preguntas que aún quedan sin responder sobre la epidemiología y evolución de los virus de la influenza. Trabajos recientes indican que la dinámica evolutiva de los virus de la influenza es más complejo de lo pensado, reflejando un interjuego intrincado entre la variación antigénica, selección natural y reordenamiento. Un entendimiento comprensivo de la evolución de los virus de la influenza requerirá el análisis completo de todo el genoma de los distintos subtipos, hospedadores y áreas geográficas, incluyendo regiones tropicales, así como el desarrollo de modelos epidemiológicos más realistas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abed Y, Bourgault A, Fenton R. (2002). Characterization of two influenza A (H3N2) clinical isolates with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors due to mutations in the hemagglutinin gene. *J Infect Dis* (186), 1074-80.

Albo C, Valencia A, Portela A. (1995). Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the Influenza A virus NP polypeptide. *J Virol.* 69, 3799-806.

Air G, Laver W.G. (1990). The neuraminidase of influenza virus. *Proteins* 6 (4), 341-56.

Alexander D. (2007). An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 25:5637-44.

Anisimova M, Gascuel O. (2006). Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-552.

Ansaldi, F., D'Agaro, P., De Florentis, D., Puzelli, S., Lin, Y., Gregory, V., Bennett, M., Donatelli, I., Gasparini, R., Crovari, P., Hay, A. & Campillo, C. (2003). Molecular characterization of influenza B viruses circulating in northern Italy during the 2001-2002 epidemic season. *J Med Virol* 70, 463-469.

Babu Y, Chand P, Bantia S, Kotian P, Dehghani A, El Kattan Y, Lin Y, Hutchinson T, Elliot A, Parker C, Ananth S, Horn L, Laver G, Montgomery J.(2000). BCX-1812: discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J.Med.Chem.*43:3482-3486.

Bardiya N, Bae J.(2005). Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Appl Microbiol Biotechnol* 67 (3): pp. 299–305

Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Faniing TG, Zheng H. (2001). Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene NS segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA.*98:2746-51.

Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok R.(1994). Structure of Influenza virus RNP. *Embo J.* (13):3158-65.

- Baz M, Abed Y, Nehme B, Boivin G. (2008).** Activity of the oral neuraminidase inhibitor A-322278 against the oseltamivir resistant H274Y A/H1N1 influenza mutant in mice. *Antimicrob Agents Chemoter.*
- Beveridge W. (1991).** The chronicle of Influenza epidemics. *Pubbl.Stn.Zool.Napoli II.*13:223-234.
- Biswas S, Boutz P, Nayak D. (1998).** Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*;72:5493-501.
- Biota Holdings. (2008).** LANI phase II completed-phase III scheduled. Melbourne: Biota Holdings.
- Blackburne B, Hay A, Goldstein R. (2008).** Changing selective pressure during antigenic changes in human influenza H3. *Plos Pathog*,4:e1000058.
- Blick T, Tiong T, Sahasrabudhe A, Varghese J, Colman P, Hart G, Bethell R, McKimm-Breschkin J. (1995).** Generation and characterization of an influenza virus neuraminidase variant with decreased sensitivity to the neuraminidase specific inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Virology.* 246:95-103.
- Bloom J, Gong L, Baltimore D. (2010).** Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza virus oseltamivir resistance. *Science.* 328:1272-1275.
- Bloom J, Arnold F. (2009).** In the light of directed evolution: pathways of adaptative protein evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.*101: 9205-9210.
- Blyth C, Iredell J, Dwyer D. (2009).** Rapid test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 361:2493.
- Bosch F, Orlich M, Klenk H. (1981).** The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95(1), 197-207.
- Bright RA, Shay D, Shu B, Cox N, Klimov A. (2006).** Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295:891-894.
- Bright RA, Medina M, Xu X, Perez-Oroz G, Wallis T, Davis X, Povinelli L, Cox N, Klimov A.(2005).** Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366:1175-1181.
- Burnet F. (1936).** Influenza virus on the developing egg. Changes associated with the development of an egg-passage strain of virus. *Br J Exp Pathol.* 19. 281-290.

Caas L, Efthymiopoulous C, Bye A. (1999). Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled, or intranasal administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacokin.* 36 (Suppl 1:1-11).

Cannell J. (2006). Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect.*134: 1129-1140.

Centers for Disease Control and Prevention, CDC. (2010). Updated interim recommendations for the use of antiviral medications in the treatment and prevention of influenza for the 2009-2010 season. <http://www.cdc.gov/H1N1flu/recommendations.htm>

Centers for Disease Control and Prevention, CDC. (2006). High levels of amantadine resistance among influenza A(H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents—the United States, 2005-2006 influenza season.*MMWR.*55:44-46.

Centers for Disease Control and Prevention, CDC.(1991). Update:influenza activity—United States and worldwide, and the composition of the 1991-1992 influenza vaccine.*MMWR.*40,231-9.

Chan C., Wu M., Huang C., Wu K., Liu W. (1999). Genetic characterization of the hemagglutinin of two strains of influenza B virus co-circulated in Taiwan.*J Med Virol* **59**,208-214.

Chen W, Calvo P, Malide D, Gibbs J, Schubert U. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Med*, 7: 1306-1312.

Claas E., Osterhaus A., Van Beek R., De Jong J., Rimmelzwaan G., Senne D., Krauss S., Shortridge K., Webster R.(1998). Human Influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian Influenza virus.*Lancet.*351:472-477.

Colman P, Varghese J, Laver W. (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature.*303:41-4.

Cox NJ, Subbarao K. (2000). Global epidemiology of Influenza: past and present. *Annu Rev Med.* 51:407-21.

Cox NJ., Bender CA.(1995). The molecular epidemiology of Influenza viruses. *Semin Virol* **6**:359-38-70.

Cox N, Xu X, Bender C. (1993). Evolution of haemagglutinin in epidemic variants and selection of vaccine viruses. In: Hannoun C. Options for the control of influenza II,pp223-30. Elsevier, North Holland.

- Dannevig B, Falk K, Namork R. (1995).** Isolation of the causal virus of infectious salmon anemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J gen Virol* 76, 1353-9.
- Dauber B, Heins G, Wolff T. (2004).** The Influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Clin Virol* 78, 1865-1872.
- Dawood F, Jain S, Finelli L. (2009).** Emergence of a novel swine-origin influenza A(H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 360 (25), 2605-15.
- De Jong JC, Beyer WE, Palache AM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. (2000).** Mismatch between the 1997/98 Influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol* 61:94-99.
- De Visser J, Elena S. (2007).** The evolution of sex: empirical insights into the roles of epistasis and drift. *Nat Rev Genet.*8:139-149.
- Deem M, Pan K, (2009).** The epitope regions of H1-subtype influenza A, with application to vaccine efficacy. *Protein Eng Design Select*, 9: 543-546.
- Deroo T, Min Jou W, Fiers W. (1996).** Recombinant neuraminidase vaccine protects against lethal influenza. *Vaccine.*14:561-9.
- Deshpande K., Fried V., Ando M., Webster R. (1987).** Glycosylation affects cleavage of an H5N2 Influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*84:36-40.
- Deyde V, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith C, Zhang Y, Shu Y, Gubareva L, Cox N, Klimov A.(2007).** Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 196:249-257.
- Digard P, Blok V, Inglis S. (1996).** Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* 216:326-37.
- Drummond A, Ho S, Phillips M, Rambaut A. (2006).** Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biol*, 4: 88.
- Drummond A, Rambaut A, Shapiro B, Pybus O. (2005).** Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol*, 22: 1185-1192.

Duffy S, Shackelton L, Holmes E. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9:267-276.

Dushoff J, Plotkin JB, Levin SA, Earn DJ. (2004). "Dynamical resonance can account for seasonality of influenza epidemics." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(48):16915–6. [PMID: 15557003](#)

Easterday BC. (1975). Animal influenza. In: Kilbourne ED, ed. *The influenza viruses and influenza.* Orlando: Academic Press, 449-481.

Ellis J, Fleming D, Zambon M. (1997). Multiplex reverse transcription PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol.* 35: 2076-2082.

Elton D, Medcalf L, Bishop K, Harrison D, Digard P. (1999). Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol.* 73:7357-67.

Enami M. (2002). Reverse genetics. *Vaccine.* 20:S61.

Ennis F, Rook A, Hua Q. (1981). HLA-restricted virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to live and inactivated influenza vaccines. *Lancet.* ii:887-891.

Falcon A, Fortes P, Marion R, Beloso A, Ortin J. (1999). Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of stauferin in vivo and in vitro. *Nucleic Acid Res.* 27:2241-7.

Ferraris O, Lina B. (2007). Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol.*

Fields S, Winter G. (1982). Nucleotide sequences of Influenza virus segments 1 and 3 reveal mosaic structure of a small viral RNA segment. *Cell.* 28:303-313.

Fiers W, De Filette M, Birkett A, Neiryneck S, Min Jou W. (2004). A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res.* 103 (1-2): pp. 173–6

Finkelman B, Viboud C, Koelle K, Ferrari M, Bharti N, Grenfell B. (2007). Global patterns in seasonal activity of influenza A/H3N2, A/H1N1, and B from 1997 to 2005: viral coexistence and latitudinal gradients. *Plos One,* e1296.

Flint S, Enquist L, Krug R, Racaniello, Skalka A. (2000). Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis and control. Cap.4. ASM, Press, Washington D.C.

- Fraser C, Donnelly C, Cauchemez S, Hanage W, Van Kerkhobe M, Deirdre T, Griffin J, Baggaley R, Jenkins H, Lyons E, Jombart T, Hinsley W, Grassly N, Ballaoux F, Ghani A, Ferguson N. (2009).** Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science*.
- Frost W. (1920).** Statics of influenza morbidity. *Public Health Rep.*35:584-97.
- Fujimoto S, Kobayashi M, Uemura O, Iwasa M, Ando T, Katoh T, Nakamura C, Maki N, Togari H, Wada Y. (1998).** PCR on cerebrospinal fluid to show influenza-associated acute encephalopathy or encephalitis. *Lancet* **352**, 873-875.
- Furuta Y, Takahaschi K, Kuno-Maekawa M. (2005).** Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemoter.* 49: 981-6.
- Gamblin S, Skehel J. (2010).** Influenza hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *J Biol Chem*, 285(37): 28403–28409.
- Garten R, Davis C, Russell C. (2009).** Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325 (5937), 197-201.
- Garten W, Klenk H. (1999).** Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 7(3), 99-100.
- Glezen W. (1996).** Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev.* 18(1):64-76.
- Glezen W, Payne A, Snyder D., Downs T. (1982).** Mortality and Influenza. *J. Infect.Dis.* **146**: 313-321.
- Glezen P., Couch R. (1978).** Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76. *N Engl J Med.* 298, 587-592
- Glinsky G. (2010).** Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. *Cell Cycle* 9: 958-970.
- Gomez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Perez Pastrana E, Portela A. (1999).** Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol.*80:1635-45.
- Goñi N, Fajardo A, Moratorio G, Colina R, Cristina J. (2009).** Modeling gene sequences over time in 2009 H1N1 influenza A virus populations. *Virology J*, 6: 215-222.

- Gray G, McCarthy T, Capuano A, Setterquist S, Olsen C, Alavanja M.(2007).** Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis.* 13:1871-8.
- Green J, Charette P, Yeh T, Smith C. (1982).** Presence of interferon in acute and convalescent phase sera of humans with influenza or an influenza-like illness of undetermined etiology. *J Infect Dis.* 145:837-841.
- Guan Y, Poon L, Cheung C, Ellis T, Lim W, Lipatov A, Chan K, Sturm-Ramirez K, Leung Y, Yuen K, Webster RG, Peiris J.(2004).** H5N1 influenza:a protean pandemic threat. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*101:8156-8161.
- Guan Y, Peiris J, Lipatov A, Ellis T, Dyrting K, Krauss S, Zhang L, Webster RG, Shortridge K. (2002).** Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*99:8950-55.
- Gubareva L. (2004).** Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res.*103:199-203.
- Gubareva L, Matrosovich M, Brenner M, Bethell R, Webster RG. (1998).** Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis.* 178:1257-62.
- Gupta V, Earl D, Deem M. (2006).** Quantifying influenza vaccine efficacy and antigenic distance. *Vaccine* 24: 3881-3888.
- Gutierrez, Eliana Battaggia, LI, Ho Yeh, Santos, Ana Catarina De Seixas.(2001).** Effectiveness of influenza vaccination in elderly outpatients in São Paulo city, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online].* vol. 43, no. 6.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. (2005).** PHYML online- a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33: W557-559.
- Hak E, Buskens E, van Essen GA, de Bakker DH, Grobbee DE, Tacken MA, van Hout BA, Verheij TJ. (2005).** "Clinical effectiveness of vaccination in persons younger than 65 years with high-risk medical conditions: the PRISMA study". *Archives of Internal Medicine* 165 (3): 274–280.
- Hata M, Tsuzuki M, Goto Y, Kumagai N, Harada M, Hashimoto M, Tanaka S, Sakae K, Kimura T, Minawaga H, Miyazaki Y. (2007).** High frequency of amantadine-resistant

influenza A (H3N2) viruses in the 2005-2006 season and rapid detection of amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses by MAMA-PCR. *Jpn J Infect Dis* 60, 202-204.

Hay A. (1998). The virus genome and its replication, chapter 4. In: Nicholson K, Webster RG, Hay A. *Textbook of Influenza*. Blackwell Science.

Hay A, Wolstenholme A, Skehel J, Smith M. (1985). The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *Embo J*.4:3021-4.

Hayden F. (2006). Antiviral resistance in influenza viruses. Implications for management and pandemic response. *N Engl J Med* 354 (8), 785-8.

Hayden F, Hay H. (1992). Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr.Top.Microbiol.Immunol*.176:119-130.

Heilman C, La Montagne JR. (1990). Influenza: status and prospects for its prevention, therapy, and control. *Pediatr Clin North Am*.37:669-88.

Hensley S, Das S, Gibbs J, Bailey A, Schimdt L, Bennink J, Yewdell J. (2011). Influenza A virus hemagglutinin antibody escape promotes neuraminidase antigenic variation and drug resistance. *Plos One* (6) e15190.

Hill D, Baron S, Perkins J, Worthington M, van Kirk J, Mills J, Kapikian A, Chanock R. (1972). Evaluation of an interferon inducer in viral respiratory disease. *JAMA*.219:1179-84.

Hinshaw V, Bean W, Webster RG. (1978). The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology*.84:51-62.

Holmes E. (2010). Helping the resistance. *Science*, 328:1243-1244.

Holmes E. (2009). RNA virus genomics: a world of possibilities. *J Clin Invest* 119: 2488-2495.

Holmes E, Ghedin E, Miller N, Taylor J, Bao Y.(2005). Whole genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *Plos Biol*.3:e300.

Holsinger L, Lamb R. (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Viol*.183:32-43.

- Huang J, Yang J. (2011).** Changed epitopes drive the antigenic drift for influenza A (H3N2) viruses. *BMC Bioinformatics*, 12 (Suppl 1):S31.
- Imai M., Watanabe S., Odagiri T. (2003).** Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex. *Arch Virol* **148** (10) 1873-1884.
- Ison M, Hayden F. (2002).** Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr Opin Infect Dis.* 15:355-67.
- Ito T. (2000).** Interspecies transmission and receptor recognition of Influenza A viruses. *Microbiol Immunol.* 44:423-30.
- Ito T., Couceiro J, Kelm S, Baum L, Krauss S, Castrucci M, Donatelli I, Kida H, Paulson J, Webster R, Kawaoka Y. (1998).** Molecular basis for the generation in pigs of Influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 72:7367-7373.
- Ito T, Gorman O, Bean W, Webster R. (1991).** Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol.* 65:5491-8.
- Itoh Y, Shinya K, Kiso M. (2009).** In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature.* 460: 1021-5.
- Johnson NPAS, Muller J. (2002).** Updating the accounts : global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 76:105-15.
- Kaiser K. (1990).** From gene to phenotype in drosophila and other organisms. *Bioessays.* 12:297-301.
- Kaplan M, Webster RG. (1977).** The epidemiology of influenza. *Sci Am.* 12, 88-106.
- Kati W, Montgomery D, Carrick R, Gubareva L, Maring C, McDaniel K, Steffy K, Molla A, Hayden F, Kempf D, Kohlbrenner W. (2002).** In viro characterization of A-315675, a highly potent inhibitor of A and B strain influenza virus neuraminidases and influenza virus replication. *Antimicrob, Agents Chemother.* 46:1014-1021.
- Kawaoka Y. Influenza viruses. (2001).** *Encyclopedia of life sciences.* 1-10.
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. (1989).** Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol.* 63 (11):4603-8.
- Kawaoka Y, Webster RG. (1988).** Sequence requirements for cleavage activation of Influenza virus in nature. *microb. Pathog.* 5:311-318.

Kilbourne E. (1998). In: Plotkin SA, Mortimer EA. Vaccines. Philadelphia: WB Saunders, p420.

Kilbourne ED. (1987). Influenza. New York: Plenum.

Kilbourne ED. (1975). The influenza viruses and influenza. New York: Academic Press.

Klenk H, Rott R, Orlich M, Bledo J.(1975). Activation of Influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*.68:426-439.

Klimov A, Rocha L, Hayden F, Schult P, Roumillat L, Cox N.(1995). Prolonged shedding of amantadine-resistant influenza A viruses by immunodeficient patients: detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. *J.Infect.Dis.* 172:1352-1355.

Knobler S, Mack A, Mahmoud A, Lemon S. (2005). The Story of Influenza. The Threat of Pandemic Influenza: Are We Ready? Workshop Summary. Washington, D.C.: The National Academies Press. pp. 60–61.

Koopmans M, Fouchier R, Wilbrink B, Meijer A, Natrop G, Osterhaus A, van Steenberger J, du Ryvan van Beest Holle M, Conyn M, Bosman A. (2003). Update on human infections with highly pathogenic avian influenza virus A/H7N7 during an outbreak in poultry in the Netherlands. *Eurosurveill.Wkly*.7:1-4.

Kubo S, Tomozawa T, Kubata M, Tokumitau A, Yamashita M. (2010). Laninamivir prodrug CS-8958, a long-acting neuraminidase inhibitor, shows superior anti-influenza virus activity after a single administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:1256-64.

Kumar S, Tamura K, Nei M. (2004). MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5, 150-163.

Lackemby A, Hungnes O, Dudman S, Meijer A, Paget W, Hay A, Zambon M. (2008). Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill* 13 (5): pii:8026.

Lackemby A, Democratis J, Siqueira M, Zambon M. (2008b). Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasiespecies. *Antivir Ther.* 13 (6): 809-20.

Lamb R., Krug R.(1996). Orthomyxoviridae:the viruses and their replication,cap 45.,p.1353-1395.En B.N.Fields, D.Knipe, and P.Howley (ed), Fields virology,3rd ed.Lippincott Raven, PA.

- Lamb R. (1989).** Genes and proteins of the influenza viruses, In: Krug R, ed. The influenza viruses. New York: Plenum, pp1-87.
- Lamb R, Zebedee S, Richardson C. (1985).** Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface. *Cell*.40:627-33.
- Lamb R, Choppin P, Chanok R. (1980).** Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci. USA* 77 (4), 1857-61.
- Laver W., Bischofberger N., Webster R. (1999).** Desarme de los virus de la gripe. *Investigación y Ciencia*. p58-67.
- Laver W, Air G, Webster RG, Markoff L.(1982).** Amino acid sequence changes in antigenic variants of type A influenza virus N2 neuraminidase. *Virology* 122:450-460.
- Lazarowitz S, Choppin P. (1975).** Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 68 (2), 440-454.
- Li Y, Yamakita Y, Krug R. (1998).** Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence:the effector domain of the influenza NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci.USA*.95:4864-9.
- Lin Y, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarao K, Guan Y, Krauss S, Shortridge K, Webster RG, Cox N, Hay A.(2000).** Avian to human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses:relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.97:9654-9658.
- Lole K, Bollinger R, Parnjape R, Gadkari D, Kulkarni S. (1999).** Full length human immunodeficiency virus type I genomes from subtype C- infected seroconverts in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73: 152-160.
- Louie J, Acosta M, Winter K. (2009).** Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A (H1N1) infection in California. *JAMA*,302:1896-902.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. (2007).** Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog.* 3 (10): pp. 1470–6.
- Macdonald S, Watson K, Cameron R. (2004).** Potent and long term acting dimeric inhibitors of influenza virus neuraminidase are effective at once-weekly dosing regimen. *Antimicrob Agents Chemoter.* 48: 4542-9.

- Mahy B. (1983).** Mutants of influenza virus. In Palese P, Kingsbury D. Genetics of influenza viruses. Springer Verlag, Wien, p192-253.
- Mastrovovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster RG. (1999).** The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73:1146-1155.
- McHardy A, Adams B. (2009).** The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *Plos Path.* 5:e1000566.
- McKimm-Breschkin J. (2005).** Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: detection, incidence and implications of drug resistance. *Treat Respir Med* 4 (2), 107-16.
- McKimm-Breschkin J. (2000).** Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors-a review. *Antivir. Res.* 47:1-17.
- McKimm-Breschkin J, McDonald M, Blick T, Colman P. (1996).** Mutation in the influenza virus neuraminidase gene resulting in decreased sensitivity to the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en leads to instability of the enzyme. *Virology.* 225:240-2.
- Medeiros R, Escriou N, Naffakh N, Manuguerra J, van der Werf S. (2001).** Hemagglutinin residues of recent human A (H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes. *Virology,* 289: 74-85.
- Memoli M, Jagger B, Dugan V, Jadon L, Taubenberger K. (2009).** Recent human influenza A/H3N2 virus evolution driven by novel selection factors in addition to antigenic drift. *L Infect Dis.* 15;200 (8):1232-1241.
- Mendel D, Tai C, Escarpe P, Li W, Sidwell R, Huffman H, Sweet C, Jakeman K, Merson J, Lacy S, Lew W, Williams L, Zhang L, Chen M, Bishofberger N, Kim C. (1998).** Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:640-646.
- Moreland J, Gramada A, Buzko O, Zhang Q, Bourne P. (2005).** The molecular biology toolkit (mbt): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics* 6:21.
- Moscona A. (2009).** Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med* 360 (10), 953-6.

- Moscona A.(2006).** Neuraminidase inhibitors for influenza. *N.Engl.J.Med.*353:1363-1373.
- Moscona A. (2005).** Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 353 (13), 1363-73.
- Mould J,Li H, Dudlak C, Lear J, Pekoz A, Lamb R, Pinto L. (2000).** Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza A virus. *J Biol Chem.*275:8592-9.
- Murphy B, Webster RG. (1996).** Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*, third edition.
- Murphy B, Baron S, Chalhub E, Uhlenendorf C, Chanok R. (1973).** Temperature sensitive mutants of influenza viruses. Induction of interferon in the nasopharynx by wild type and a temperature sensitive recombinant virus. *J Infect Dis.* 128:488-93.
- Nakajima S, Takeuchi Y, Nakajima K.(1988).** Location on the evolutionary tree of influenza H3 haemagglutinin genes of Japanese strains isolated during 1985-86 season. *Epidemiol Infect.* 100:301-10.
- Nakajima K, Desselberger U, Palese P. (1978).** Recent influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature.*274:334-339.
- Nayak D, Hui E, Barman S. (2004).** Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 106 (2): pp. 147–65.
- Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J. (2009).** The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *Plos Curr Influenza* RRN1126.
- Nelson M, Viboud C, Simonsen L, Bennett R, Griesemer S, George K, Taylor J, Spiro D, Sengamalay N, Ghedin E, Taubenberger J, Holmes E. (2008).** Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLOS Pathog* 4(2): e1000012.
- Nelson M, Holmes E. (2007).** The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.*8:196-205.
- Nelson M, Simonsen L, Viboud C, Miller M, Taylor J, st George K, Griesemer S, Ghedi E, Sengamalay N, Spiro D, Grenfell B, Lipman D, Taubenberger J, Holmes E. (2006).** Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. *PLOS Pathog* 2(12):e125.

- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. (2009).** Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459 (7249), 931-9.
- Neumann G, Hughes M, Kawaoka Y. (2000).** Influenza A virus NS2 mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J.*19:6751-8.
- Nichol, K.L., Nordin, J.D., Nelson, D.B., Mullooly, J.D., & Hak, E. (2007).** Effectiveness of Influenza Vaccine in the community-dwelling elderly. *The New England Journal of Medicine*, 357(14), 1373-1381.
- Nicolson K, Webster R, Hay A. (1998).** Textbook of Influenza. Oxford:Blackwell Science.1998.
- OMS. (2006).** Recommended composition of influenza vaccines for use in the 2006-2007 influenza season.
- Orlich M., Gottwald H., Rott R.(1994).** Orthomyxoviridae: the viruses and their replication,p.1353-1395.En B.N.Fields, D.Knipe, and P.Howley (ed), *Fields virology*,3rd ed.Lippincott Raven, PA.
- Orlich M., Khatchikian D., Teigler A., Rott R. (1990).** Orthomyxoviridae: the viruses and their replication,p.1353-1395.In B.N.Fields, D.Knipe, and P.Howley (ed), *Fields virology*,3rd ed.Lippincott Raven, PA.
- Oxford J. (2000).** Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918:virology,pathology and epidemiology. *Rev Med Virol.*10:119-133.
- Paglioni S. (1999).** Estructura y función de los virus.En: virus receptores y coreceptores celulares (ed.).CTM Serv.Bib.S.A.Buenos Aires, pp45-97.
- Palese P, Compans R. (1976).** Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* 33 (1), 159-63.
- Patterson, KD; Pyle GF. (1991).** The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 65 (1): 4–21.
- Patterson K. (1986).** Pandemic Influenza 1700-1900: a study in historical epidemiology.Rowman and Littlefield:New Jersey.

- Peiris J, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge K. (2001).** Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75:9679-9686.
- Perales B, Sanz-Ezquerro J, Gastaminza P, Ortega J, Fernandez J, Ortin J, Nieto A. (2000).** The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J Virol.* 74:1307-12.
- Portela A, Zurcher T, Nieto A, Ortin J. (1999).** Replication of Orthomyxoviruses. *Adv Virus res.* 54:319-48.
- Portela A, Melero J, Martinez C, Domingo E, Ortin J. (1985).** A primer vector system that allows temperature dependent gene amplification and expression in mammalian cells: regulation of the influenza virus NS1 gene expression. *Nucleic Acids Res.* 13:7959-77.
- Posada D, Crandall K. (2001).** Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *SysT Biol* 50: 580-601.
- Potdar V, Chadna M, Jadhaw S, Mullick J, Cherian S. (2010).** Genetic characterization of the influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus isolates from India. *Plos One* 5: e9693.
- Potter CW. (2006).** A History of Influenza. *J Appl Microbiol.* 91 (4): 572–579
- Potter CW. (1998).** Chronicle of influenza pandemics. En Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. *Textbook of Influenza.*
- Pyle GF.** The diffusion of Influenza patterns and paradigms. (1986). New Jersey: Ravan & Littlefield.
- Rambaut A, Pybus O, Nelson M, Viboud C, Taubenberger J. (2008).** The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 453:615-619.
- Rameix-Welti M, Agou F, Buchy P, Mardy S, Aubin J. (2006).** Natural variation can significantly alter sensitivity to oseltamivir of influenza A (H5N1) viruses. *Antimicrob Agents Chemoter* 50: 3809-3815.
- Rasmussen AF, Stokes J, Smadel JE. (1948).** The army experience with influenza, 1946–1947. *Am J Epidemiol* 47: 142–149.
- Raymond F, Caton A, Cox N. (1986).** The antigenicity and evolution of influenza H1 hemagglutinin from 1950-1957 and 1977-1983: two pathways from one gene. *Virology* 148 (2), 275-87.

- Reece P. (2007).** Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses. *J. Med. Virol.*79:1577-86.
- Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. (2001).** The 1918 Spanish Influenza: integrating history and biology. *Microbes Infect.* 3 (1):81-7.
- Reid AH, Taubenberger JK. (1999).** The 1918 flu and other influenza pandemics: ‘over there’ and back again. *Lab Invest.*79(2):95-101.
- Reis J, John D, Heimeroth A, Mueller H, Oertel W, Arndt T, Rosenow F.(2006).** Modulation of human motor cortex excitability by single doses of adamantane. *Neuropsychopharmacology* 31:2758-2766.
- Robertson J. (1993).** Clinical influenza virus and the embryonated hens eggs. *Rev Med Virol.*3:97-106.
- Robertson J, Naeve C, Webster R, Bootman J, Newman R, Schild G. (1985).** Alterations in the haemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology.*143:166-74.
- Rogers G, Paulson J. (1983).** Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127 (2), 361-73.
- Rota PA., Hemphill M., Whistler T., Regnery H., Kendal A. (1992).** Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent co-circulating strains of Influenza B virus. *J Gen Virol.*73:2737-2742.
- Ruben F. (1990).** Now and future influenza vaccines. *Infect Dis Clin North Am.*4:1-10.
- Russell C, Jones T, Barr I, Cox N, Garten R, Gregory V, Gust I, Hampson A, Hay A, Hurt A, de Jong J, Kelso A, Klimov A, Kageyama T, Komadina N, Lapedes A, Lin T, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus A, Rimmelzwaan G, Shaw M, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier R, Simth D. (2008).** The global circulation of seasonal influenza A(H3N2) viruses. *Science.*320:340-346.
- Saito R, Li D, Shimomura C. (2006).** An off-seasonal amantadine resistant influenza AH3 viruses isolated during the 2005-2006 winter season in Nara, Japan. *Jpn Infect Dis.*60:53-54.

- Saito R, Sakai T, Sano Y, Oshitani H, Sato M, Suzuki H. (2003).** Frequency of adamantane resistant influenza A viruses during two seasons featuring cocirculation of H1N1 and h3N2. *J Clin Microbiol* 41:2164-2165.
- Salminen M, Carr J, Burke D, McCutchan F (1995).** Identification of brak-points in intergenotyping recombinants of HIV type I by bootscanning. *AIDS res Hum Retroviruses* 11: 1423-1425.
- Sanjuan R, Cuevas J, Moya A, Elena S. (2005).** Epistasis and the adaptability of an RNA virus. *Genetics* 170:1001-1008.
- Sartwell PE, Long AP .(1948).** The army experience with influenza, 1946–1947. *Am J Epidemiol* 47: 135–141.
- Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R . (1978).** On the origin of the human influenza virus subtype H2N2 and H3N2. *Virology* 87: 13–20.
- Scholtissek C, von Hoyningen V, Rott R. (1978).** Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1847 and 1957 (H1N1). *Virology* , 89 (2):613-17.
- Schope R. (1931).** Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med.* 54:373-85.
- Sha B, Luo M. (1997).** Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol.*4:239-44.
- Shay D. (2008).** Panel Advises Flu Shots for Children Up to Age 18. Publicado en New York Times.
- Shek LP, Lee BW.(2003).** Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatr Respir Rev.* Jun;4(2):105–11. [PMID 12758047](#)
- Shimodara H, Hasegawa M. (2001).** CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 17: 1246-1247.
- Shinde V, Bridges C, Uyeki T. (2009).** Tripe-reassortant swine influenza A(H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 360(25), 2616-25.
- Shope RE. (1936).** The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages. *J Exp Med.*63:669-84.

Shope RE. (1931). Swine influenza.III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med.* 54:373-380.

Shortridge k, Harris S. (1982). An Influenza epicentre?.*Lancet.*2:812-813.

Simonsen L, Viboud C, Grenfell B, Dushoff J, Jennings L, Smit M, Macken C, Hata M, Gog J, Miller M, Holmes E.(2007a). The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Mol Biol Evol* 24:1811-1820.

Simonsen, L., Taylor, R.J., Viboud, C., Miller, M.A., & Jackson, L.A. (2007). Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: An ongoing controversy. *The Lancet Infectious Diseases*, 7, 658-666.

Simonsen L. (2007). Commentary: observational studies and the art of accurately measuring influenza vaccine benefits. *Int J Epidemiology* (36) 631-632.

Smith G, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett S, Worobey M, Pybus O, Kit Ma S, Cheung C, Ragwani J, Bhatt S, Malik Peiris J, Guan Y, Rambaut A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*.

Smith D, Lapedes A, de Jong J, Bestebroer T, Rimmelzwaan G. (2004). Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305: 371-376.

Smith B, McKimm-Breshikin J, McDonald M, Fernley R, Varghese J, Colman P. (2002). Structural studies of the resistance of influenza virus neuraminidase to inhibitors. *J Med Chem.* 45: 2207-12.

Smith FL, Palese P. (1989).Variation in influenza virus genes: epidemiology, pathogenic and evolutionary consequences. In: Krug RM.ed. *The influenza viruses.* New York:Plenum Press.

Steinhauer D. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258 (1), 1-20.

Stevens J, Corper A, Basler C, Taubenberger JK, Palese P. (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303:1866-1870.

Stockton J, Ellis J, Saville M, Clewley J, Zambon M. (1998). Multiplex PCR for typing and subtyping Influenza and respiratory syncytial viruses.*J.Clin.Microbiol.*36:2990-2995.

- Stuart-Harris CH, Schild GC, Oxford JS. (1985).** Influenza: the virus and the disease. Edward Arnold:London.
- Suarez D, Spackman E, Senne D. (2003).** Update on molecular epidemiology of H1, H5 and H7 influenza virus infections in poultry in North America. *Avian Dis.* 47 (Suppl.3): 888-897.
- Subbarao K, Katz J. (2007).** Influenza vaccines generated by reverse genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: pp. 313–42.
- Suzuki Y, Nei M. (2002).** Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* 19 (4): 501-509.
- Suzuki Y., Ito T., Suzuki T. (2000).** Sialic acid species as a determinant of the host range of Influenza A viruses. *J.Virol.*74:11825-11831.
- Takeuchi K., Lamb R. (1994).** Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport.*J.Virol.*68:911-919.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007).** MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software versión 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tang J, Ngai K, Wong J, Lam W, Chan P. (2008).** Emergence of adamantane resistant influenza A(H3N2) viruses in Hong Kong between 1997 and 2006. *J Med Virol.*80:895-901.
- Taylor W, Thin B, Anh G. (2008).** Oseltamivir is adequately absorbed following nasogastric administration to adult patients with severe H5N1 influenza. *Plos One.*3: e3410.
- Taubenberger JK, Reid A, Janczewski T, Fanning T. (2001).** Integrating historical, clinical and molecular data in order to explain the origin and virulence of the 1918 spanish influenza virus. *Phil Trans R Soc Lond.* B356:1829-39.
- Taubenberger JK, Reis AH, Fanning TG. (2000).** The 1918 influenza virus: a killer comes into view. *Virology.*274:241-5.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T. (2004).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22, 4673-4680.
- Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M. (1975).** Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol.* (162) 9-14.

Trifonov V, Khiabani H, Greenbaurn B, Rabadan R. (2009). The origin of the recent swine influenza A (H1N1) virus infecting humans. *Euro Surveill.* 14 (17):pii 19193.

Valdez Aguilar R. (2002). Pandemia de gripe. *Elementos*, 47(9): 37-43.

Van Voris L, Newell P. (1992). Antivirals for the chemoprophylaxis and treatment of influenza. *Semin Respir Infect* (7), 61-70.

Varghese J, Smith P, Sollis S, Blick T, Sahasrabudhe A, McKimm Breschkin J, Colman P. (1998). Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant on influenza virus neuraminidase. *Structure*.6:735-46.

Varghese J, Laver W, Colman P. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 303 (5912), 35-40.

Viboud C, Alonso W, Simonsen L. (2006). Influenza in tropical regions. *Plos Med* 3:e89.

Viboud C, Tam T, Fleming D, Miller M, Simonsen L. (2006). 1951 influenza epidemic, England and Wales, Canada, and the United States. *Emerg Infect Dis* 12: 661–668.

Wagner R, Mastrovich M, Klenk H. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev in Med Virology*, 12: 159-166.

Wang S, Du Q, Chou K. (2007). Study of drug resistance of chicken influenza A virus (H5N1) from homology-modeled 3D structures of neuraminidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 354:634-40.

Wang C, Takeuchi L, Pinto L, Lamb R. (1993). Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J.Virol.*67:5585-5594.

Webby R y cols. (2000). Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J.Virol.* 74:8243-8251.

Webster RG., Bean WJ., Gorman OT., Chambers TM., Kawaoka Y.(1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179.

Webster RG, Brown L, Laver W. (1984). Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies. *Virology* 135 (1), 30-42.

Webster RG., Laver WG., Air GM., Schild GC.(1982). Molecular mechanisms of variation in Influenza viruses. *Nature* 296:115-121.

- Weistock D, Zuccotti G. (2006).** Adamantane resistance in influenza A. *JAMA* 295:984-986.
- Wolf Y, Viboud C, Holmes E, Koonin E, Lipman D. (2006).** Long intervals of stasis punctuated by burst of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus. *Biol Direct*, 1:34.
- World Health Organization (WHO). (2010).** Update on oseltamivir-resistant pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus: January 2010. *Wkly Epidemiol rec*: 85:37-40.
- World Health Organization (WHOa). (2009).** Transmission dynamics and impact of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus. *Wkly Epidemiol Rec*. 84:481-4.
- World Health Organization (WHOb). (2009).** Clinical management of human infection with pandemic (H1N1) 2009: revised guidance. Geneva: World Health Organization, November 2009. (Accessed April 9, 2010 at [http://www.who.int/csr/resources/publications/swine flu/clinical_management/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swine_flu/clinical_management/en/index.html)).
- World Health Organization (WHO). (2009).** Pandemic H1N1 2009-Update 94. Geneva:World Health Organization, April 1, 2010. At http://www.who.int/csr/don/2010_04_01/en/index.html.
- World Health Organization (WHO c). (2009).** Clinical management of human infection with pandemic (H1N1) 2009: revised guidance. http://www.who.int.csr.resources/publications/swineflu/clinical_management_h1n1.pdf
- World Health Organization (WHO). (2008).** Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir. Available:[http:// www.who.it/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html](http://www.who.it/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html).
- World Health Organization (WHO). (2007).** Epidemic and pandemic alert and response (EPR): clinical management of human infection with avian influenza A(H5N1) virus: updated advice. Geneva:August 15. Available at [http://www.who.int/csr/disease/avian influenza/guidelines/clinicalmanage07/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/clinicalmanage07/en/index.html).
- Xu X, Cox N, Bender C, Regnery H, Shaw M. (1996).** Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. *Virology*, 224:175-183.
- Xu X, Rocha E, Regnery H, Kendal A, Cox N. (1993).** Genetic and antigenic analyses of influenza A (H1N1) viruses, 1986-91. *Virus Res*.28:37-55.

- Yamada AY, Meager A, Yamada A, Ennis F. (1986).** Human interferon alpha and gamma production by lymphocytes during the generation of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol.*67:2325-2334.
- Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W., Palese, P. (1988).** Influenza B-virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**, 112-122.
- Yang J, Lin Y, Huang Y, Su C, Lo J, Ho Y, Yao C, Hsu L, Wu H, Liu M. (2011).** Reassortment and mutations associated with emergence and spread of oseltamivir resistant seasonal influenza A-H1N1 viruses in 2005-2009. *Plos One*, 6: e18177.
- Younkin S, Betts R, Roth F, Douglas R. (1983).** Reduction in fever and symptoms in young adults with influenza A/Brazil/78 H1N1 infection after treatment with aspirin or amantadine. *Antimicrob Agents Chemother.*23:577-82.
- Yuan W., Krug RM. (2001).** Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN) induced ubiquitin-like ISG15 protei. *EMBO J* .**20**, 362-371.
- Yoneda M, Inoue Y, Kitaheri Y. (2007).** High incidence of amantadine resistant influenza A/H3 viruses isolated during 2005-2006 winter season in Nara, Japan. *Jpn J Infect Dis* 60:58-64.
- Zambon M. (2001).**The pathogenesis of Influenza in humans.*Rev.Med.Virol.*11:227-241.
- Zhirnov O. (2000).** Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology*,74:4634-44.
- Zhou H, Pophale R, Deem M. (2009).** Computer- assisted vaccine design. In: Wang Q, Tao Y (eds) *Influenza: molecular virology*. Horizon Scientific Press, Norfolk.

PUBLICACIONES

Publicaciones incluidas en la tesis

“Phylogenetic analysis of pandemic 2009 Influenza A virus circulating in the south american region: genetic relations and vaccine strain match”.

Natalia Goñi, Gonzalo Moratorio, Viviana Ramas, Leticia Coppola, Hector Chiparelli and Juan Cristina. *Archives of Virology*. 2010

“Human Influenza A viruses isolated in South America: genetic relations, adamantine resistance and vaccine strain match.”

Natalia Goñi, José C. Russi, Juan Cristina. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009 (9) 229-34.

Publicaciones no incluidas en la tesis

“Modeling gene sequences over time in 2009 H1N1 Influenza A virus populations”

Natalia Goñi, Alvaro Fajardo, Gonzalo Moratorio, Rodney Colina, Juan Cristina.

Virology Journal. 2009 (6): 215.

“Neumonía Aguda Comunitaria del adulto hospitalizado: aspectos etiológicos, clínico-terapéuticos y evolutivos”

Rosario Palacio, Dora Ruchansky, Teresa Camou, Rafael Alonso, **Natalia Goñi**, Mariana Baz, Jose C Russi, Cristina Bazet. *Arch Med Interna*, 2007; XXIX (1):14-20.

“Influenza B viruses isolated in Uruguay during 2002-2005 seasons: genetic relations and vaccine strain match”.

Natalia Goñi, Mariana Baz, Dora Ruchansky, Leticia Cópola, Jose C Russi, Juan Cristina.

Virus Research, 2007, **123** (1), 100-104.

“Primera experiencia nacional de vacunación antiinfluenza en población infantil”.

B. De Mucio, I. Iraola, H. Laurani, **N. Goñi**, M. Hortal. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 2006; **77**:13-17.