

INVESTIGACIÓN DE CIRCULACIÓN DEL VIRUS INFLUENZA EN AVES RESIDENTES Y MIGRATORIAS DEL URUGUAY.

**María José Rivas
Licenciatura en Bioquímica
Sección Virología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República**

**Orientador Dr. Juan Arbiza
Co-Orientadora MSc. Andrea Blanc**

Montevideo, 2014

Agradecimientos

Al Dr. Juan Arbiza, por brindarme la oportunidad de haber realizado mi proyecto de fin de carrera en la cátedra de Virología, por ofrecerme siempre oportunidades para mi desarrollo profesional y formar parte de su grupo de trabajo al que doy gracias por haber compartido y acompañado todos estos años.

A Msc. Andrea Blanc por ser mi referente, por sus ideas, su tiempo, dedicación, apoyo y sobre todo por brindarme su amistad.

A la Dra. Dora Ruchansky por aportar el final a este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos, por darme ánimo y alentarme todos los días.

A mi familia, mi madre Susana, mis hermanos, Eugenia, Pía y Jeremías, mi abuela Olga, mi padre Carlos y mis abuelos Alix y Miguel; por haberme brindado su apoyo siempre, en momentos alegres y en los difíciles, y sobre todo por el amor que siempre recibí.

A Ronie, por ser mi compañero, mi apoyo de todos los días, por todo el amor y el tiempo compartido.

A Renata, mi compañera de todos los días y todos los momentos.

Su presencia hace milagros en mi vida, por eso este trabajo y todos mis logros son también de Uds.

A todas las personas que han sido mi compañía durante todo este tiempo:
Muchas gracias!!

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.	BIOLOGÍA DE LOS VIRUS INFLUENZA.....	5
1.1.1.	Clasificación.....	5
1.1.2.	Nomenclatura.....	5
1.1.3.	Estructura viral y genoma de Influenza A.....	5
1.1.4.	Ciclo reproductivo	8
1.2.	ECOLOGÍA.....	11
1.2.1.	Reservorios.....	11
1.2.2.	Prevalencia genotipos	11
1.2.3.	Migración	12
1.3.	EPIDEMIOLOGÍA	15
1.3.1.	Brotos con virus de alta patogenicidad	15
1.3.1.1.	H5N1.....	15
1.3.1.2.	H7	17
1.3.2.	Brotos con virus de baja patogenicidad	17
1.3.2.1.	H5 y H7	17
1.3.2.2.	H9 y otros subtipos.....	18
1.3.3.	Influenza aviar en América del Sur.....	18
2.	OBJETIVOS.....	21
2.1.	Objetivo general.....	21
2.2.	Objetivos específicos.....	21
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1.	Colecta de muestras.....	22
3.2.	Extracción de ARN total.....	22
3.3.	Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT/PCR).....	22
3.4.	Electroforesis.....	23
3.5.	Extracción y purificación de bandas.....	23
3.6.	Clonación, transformación bacteriana, preparación de minicultivos y minipreps	24
3.6.1.	Clonación	24
3.6.2.	Transformación	24
3.6.3.	Screening – PCR M	24
3.6.4.	Minicultivos y minipreps	24
3.7.	Secuenciación y análisis de secuencias	25
4.	RESULTADOS	26

4.1.	Colecta de muestras.....	26
4.2.	Amplificación del ARN por RT/PCR.....	26
4.3.	Alineamiento de secuencias nucleotídicas y Análisis filogenético.....	27
5.	DISCUSIÓN.....	31
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUCCIÓN

En las décadas pasadas, la Influenza aviar altamente patogénica demostró ser una enfermedad devastadora en aves de corral. El subtipo viral H5N1 es ahora endémico en Asia, afecta a las poblaciones de aves de corral domésticas y representa una amenaza para la salud humana y animal.

Poca es la información que se dispone acerca de la epidemiología de estos virus en la región. En Uruguay, la Influenza aviar es una enfermedad exótica por lo que se hace necesario implementar sistemas de vigilancia para evitar la introducción y difusión del virus en el país. El objetivo del presente trabajo fue muestrear aves migratorias y residentes que pudieran ser portadoras de virus Influenza.

1.1. BIOLOGÍA DE LOS VIRUS INFLUENZA

1.1.1. Clasificación

La familia *Orthomyxoviridae*, del griego *orthos* "correcto, estándar", y *mixo*, "mucus", contiene cinco géneros (ICTV, International Committee for the Taxonomy of Viruses): Virus Influenza A, B y C, Isavirus y Thogotovirus, a veces llamados virus Influenza D. Los virus Influenza son nombrados como *Orthomyxoviridae* por su habilidad de unirse a las mucosas, y por la capacidad de hemoaglutinación, y para distinguirlos de otra familia de virus ARN de sentido negativo, *Paramyxoviridae* (Lamb and Krug 1996).

Los virus Influenza A, B y C son clasificados de acuerdo a la capacidad de reacción serológica de sus proteínas internas: Nucleoproteína (NP) y Matriz (M). A su vez los virus Influenza A son divididos en subtipos basados en la naturaleza antigénica de sus glicoproteínas de superficie: Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) (Lamb and Krug 1996). Se han identificado 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 de NA (N1-N9), todos ellos aislados de aves acuáticas (Hinshaw, Air et al. 1982, Kawaoka, Yamnikova et al. 1990, Rohm, Zhou et al. 1996, Yamnikova, Gambaryan et al. 2003, Fouchier, Munster et al. 2005). Recientemente se encontraron en murciélagos, nuevos subtipos de HA (H17) y de NA (N10) (Tong, Li et al. 2012).

1.1.2. Nomenclatura

El sistema de nomenclatura para los virus Influenza requiere que se describa el tipo de virus, el hospedador (este dato se omite en el caso de que el hospedador sea humano), el sitio geográfico del aislamiento, número de cepa, año de aislamiento. En el caso de que el tipo de virus Influenza sea A, se debe indicar entre paréntesis el tipo de HA y de NA. Por ejemplo, A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2) (WHO.Memorandum 1980).

1.1.3. Estructura viral y genoma de Influenza A

La morfología característica de estos virus es un rasgo genético pero también depende del tipo celular en el cual el virus está creciendo (Kilbourne 1963, Roberts, Lamb et al. 1998). Las partículas víricas son pleomórficas, tendientes a la forma esférica, con diámetros que oscilan entre los 80 y los 120 nm. Están compuestas por 1% de ARN, 70% de proteínas, 20% de lípidos y de un 5 a 8% de carbohidratos. La envuelta

viral deriva de la membrana plasmática de la célula hospedadora en la que el virus está replicando, alrededor de 500 espículas de entre 10 y 14 nm de longitud se encuentran sobre la superficie; estas espículas representan a dos de las principales glicoproteínas, HA y NA, en relación 5:1. También insertas aunque en menor proporción, se encuentran proteínas M2 (Ver figura 1). La proteína de Matriz, M1, la más abundante del virión, se encuentra por debajo de la membrana y está asociada a los core ribonucleoproteicos (RNPs) (Lamb and Krug 1996).

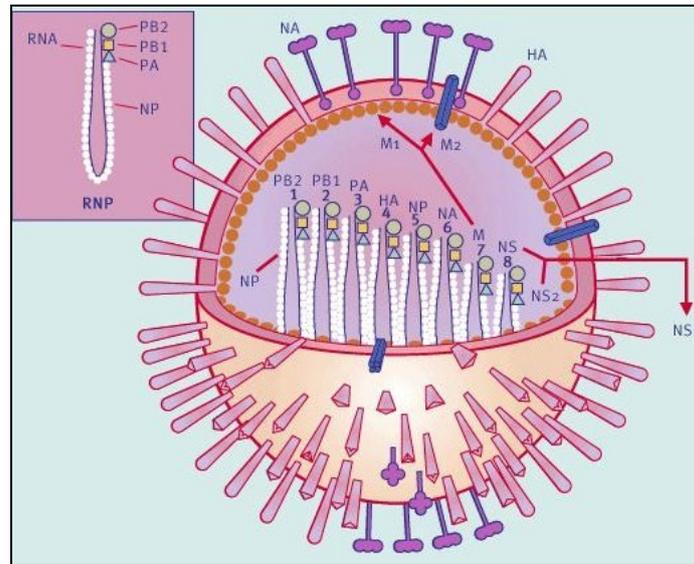


Figura 1. Representación esquemática del virus Influenza. Extraída de (Heinen 2002).

El genoma consta de 8 segmentos de ARN simple cadena de polaridad negativa que codifican para once proteínas virales: PB1, PB1-F2, PB2, PA, HA, NP, NA, M1 y M2, NS1 y NS2 (Tabla 1) (Lamb and Krug 1996, Chen, Calvo et al. 2001). Los extremos 5' y 3' de los ARN virales (ARNv) están altamente conservados y presentan secuencias complementarias invertidas. Todas las señales necesarias para la replicación y el empaquetamiento del genoma residen en estas secuencias terminales (Desselberger, Racaniello et al. 1980). Cada uno de los 8 segmentos de ARN es encapsidado con múltiples moléculas de NP viral para formar los RNPs y cada molécula de NP se encuentra asociada a unos 20 nucleótidos de ARN, manteniendo así la estructura de la nucleocápside (Ruigrok and Baudin 1995).

Los RNPs son estructuras flexibles, cada cadena se encuentra plegada sobre sí misma formando una estructura helicoidal con un "bucle" en uno de sus extremos y en el otro extremo se encuentra el promotor del ARNv que se forma por complementariedad de las secuencias terminales 5' y 3' libres. A estas secuencias se une el complejo polimerasa, un heterotrímero compuesto por subunidades de PB1, PB2 y PA, determinando así el arreglo superenrollado de los RNPs. Tales RNPs son maquinarias moleculares independientes responsables de la transcripción y replicación de cada segmento viral y su longitud depende del tamaño específico de cada segmento. En el RNP, el ARN es susceptible a la actividad ARNasa mientras que la proteína está relativamente protegida de la digestión por proteasas, sugiriendo que el ARN se encuentra por fuera de la estructura (Compans,

Content et al. 1972, Ruigrok and Baudin 1995, Coloma, Valpuesta et al. 2009).

Segmento ARN	Longitud (nt)	Proteína	Aminoácidos	Moléculas por virión
1	2341	polimerasa PB2	759	30-60
2	2341	polimerasa PB1	757	30-60
		PB1-F2	87	-
3	2233	polimerasa PA	716	30-60
4	1778	hemaglutinina HA	566	500
5	1540	nucleoproteína NP	498	1000
6	1392	neuraminidasa NA	454	100
7	1027	proteína matriz M1	252	3000
		proteína matriz M2	97	20-60
8	890	proteína no estructural NS1	230	-
		proteína no estructural NS2	121	130-200

Tabla 1. Segmentos génicos de Influenza A y proteínas codificadas. Extraída y modificada de (Lamb and Krug 1996).

Los tres segmentos más grandes de ARN codifican para las polimerasas que juntas forman el complejo polimerasa.

La polimerasa PB2 es codificada por el segmento 1, su función es conocida durante el inicio de la transcripción del ARN mensajero (ARNm) viral como la proteína que reconoce y se une al CAP 5' de los ARNm celulares para ser usados como cebadores para la transcripción viral.

La polimerasa PB1 es codificada por el segmento 2 y su función dentro del complejo polimerasa es elongar la cadena de ARNm naciente a partir del cebador. Las proteínas PB1 recién sintetizadas se localizan en el núcleo de las células infectadas. La proteína PB1-F2 es transcripta por un marco de lectura alternativo de este segmento viral y que no está presente en todos los subtipos virales (Chen, Calvo et al. 2001).

La polimerasa PA es codificada por el segmento 3, su localización es nuclear y su función es desconocida.

La proteína HA es codificada por el segmento 4. Es un homotrímero de monómeros unidos no covalentemente, cada molécula consiste en un ectodominio, un dominio transmembrana carboxi-terminal (Ct) y una cola citoplasmática. El dominio globular está formado únicamente por la subunidad HA1 y contiene el sitio receptor y los sitios antigénicos. El dominio transmembrana consiste en toda la molécula de HA2 y parte de la subunidad HA1. La región Ct de la molécula de HA2 contiene una secuencia transmembrana hidrofóbica y una secuencia citoplasmática donde es anclado el palmitato. La HA es el mayor antígeno de superficie y es responsable de la unión de los viriones a la superficie de la célula hospedadora y de la fusión entre la membrana viral y la membrana endosomal (Lamb and Krug 1996).

La NP es codificada por el segmento 5, es la segunda proteína más abundante del virión. Tiene un rol importante en el cambio de la síntesis del ARNm viral a la síntesis del ARN copia (ARNc) y ARNv en la célula infectada.

La NA es codificada por el segmento 6, es una proteína integral de membrana y es el segundo antígeno de superficie más importante. Los tetrámeros de NA no están distribuidos uniformemente por la superficie viral como lo están las moléculas de HA, sino que se encuentran formando "parches". La NA cliva moléculas de ácido siálico terminales de glicoproteínas o glicolípidos de superficie. Así su función es liberar a las partículas virales de las células receptoras, facilitando su diseminación (Lamb and Krug 1996).

La transcripción colineal del segmento 7 codifica para la proteína M1 que es la más abundante del virión. Esta proteína forma una capa alrededor de la nucleocápside y se encuentra inmediatamente por debajo de la envuelta viral. En las células infectadas se localiza en el citoplasma y núcleo y tiene un rol importante en el ensamblaje de la progenie viral. La proteína M2 es transcripta por "corte y empalme" (*splicing*, en Inglés) alternativo del segmento 7. Es una proteína integral de membrana y su dominio sirve como señal de transporte a la superficie celular. Se encuentra en grandes cantidades en la superficie celular de la célula infectada y unas pocas proteínas se encuentran en los viriones (Lamb and Krug 1996). Al igual que la NP, la proteína M es un antígeno tipo específico.

Las proteínas no estructurales, NS2 y NS1 son codificadas por el segmento 8, NS1 es traducida colinealmente con el ARNv y abunda en el citoplasma de las células infectadas. NS2 es transcripta por *splicing* del ARNm. En un principio se la clasificó como no estructural pero luego se descubrió que está presente en las partículas virales (Richardson and Akkina 1991).

1.1.4. Ciclo reproductivo

El ciclo replicativo comienza con el clivaje de la proteína HA en HA1 y HA2 por enzimas presentes en el ambiente extracelular. Las enzimas son producidas por el huésped pero pueden eventualmente ser producidas por bacterias, promoviendo la infección por Influenza. Luego del clivaje de HA, el sitio de unión al receptor de HA1 se une a un residuo de ácido siálico presente en glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular. Diferentes virus Influenza tienen diferentes afinidades por el ácido siálico según estén unidos a la galactosa con uniones α -2,3 o α -2,6, y esto depende de residuos específicos de la molécula de HA (Lamb and Krug 1996, Bentz and Mittal 2003).

El virus ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptor, se produce una invaginación recubierta de clatrina que va rodeando a la partícula hasta formar una vesícula completa que se desprende hacia el citoplasma (Lakadamyali, Rust et al. 2004). Luego de la internalización, la cubierta de clatrina es removida y las vesículas se fusionan con los endosomas, madurando de endosomas tempranos a tardíos. El bajo pH de los endosomas activa los canales M2, una bomba H^+ -ATPasa, que provoca la entrada de protones al virión. Se produce la disociación de la proteína M1 de los RNPs y un cambio conformacional en la HA de superficie que expone una secuencia de fusión, HA2 N-terminal (Skehel, Cross et al. 2001), uniendo la membrana viral y la membrana endosomal, y liberando a los RNPs al citoplasma (Bullough, Hughson et al. 1994). Las cuatro proteínas que componen el complejo RNP, PB1, PB2, PA y NP, contienen señales de localización nuclear (SLN), y los RNPs son transportados activamente al núcleo; ingresando a él a través de los poros de la membrana nuclear.

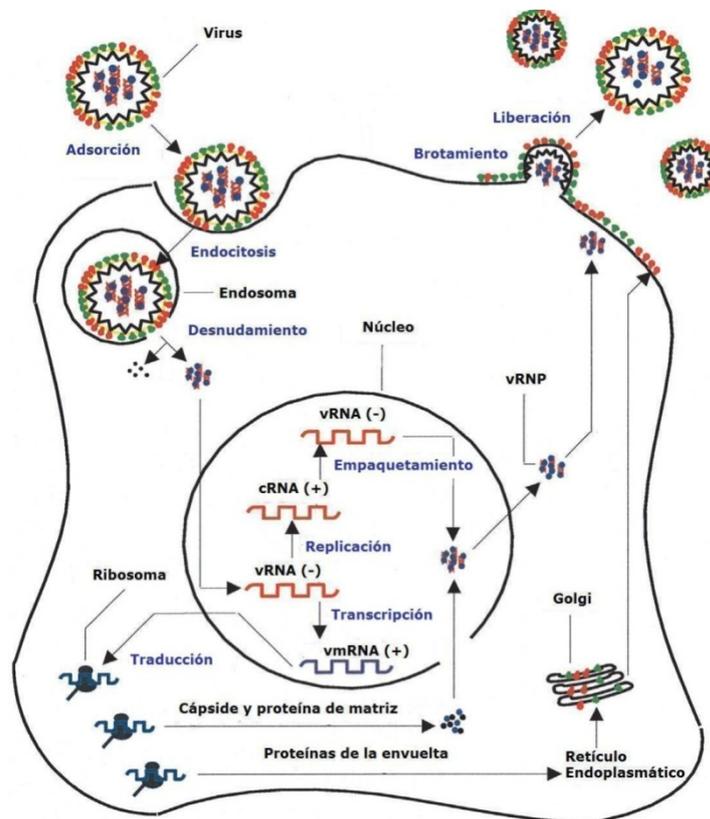


Figura 2. Ciclo de replicación de Influenza A. En azul se indican las diferentes etapas. Extraído y modificado de (Sidorenko and Reichl 2004).

En el núcleo se produce la síntesis de los ARNm virales. El complejo polimerasa se une al extremo 5' de los precursores de ARNm celulares y cliva la región del CAP que es utilizado como cebador para el inicio de la transcripción, las diferentes etapas de la síntesis está dirigida por el complejo polimerasa. El "*splicing*" de los segmentos génicos M y NS también ocurre en el núcleo y está regulado por la proteína NS1. Finalmente los ARNm recién sintetizados son transportados hacia el citoplasma. El incremento de la concentración de NP promueve el inicio de la replicación del genoma viral y bloquea la síntesis del ARNm virales. La replicación involucra la síntesis de toda la longitud de las cadenas de ARNv(-) y ARNc(+), el ARNc sirve como molde para la síntesis de ARNv y éste a su vez es utilizado para la síntesis de más ARNm viral, ARNc y para la formación de los complejos RNPv (Lamb and Krug 1996, Amorim and Digard 2006).

En esta fase de la infección, las proteínas PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 y M son producidas en el citoplasma celular. El flujo de producción de proteínas celulares baja lentamente mientras que la síntesis de las proteínas virales ocurre a flujo máximo por ribosomas (Park and Katze 1995). Las polimerasas recién sintetizadas como también las proteínas de NP, M y NS son transportadas al núcleo, donde participan en el "*splicing*" de los ARNm de M y NS, en la transcripción y replicación del genoma. Adicionalmente, son consumidas para la producción de nuevos complejos RNPv. La síntesis de M2, HA y NA es llevada a cabo por ribosomas que se encuentran unidos al retículo endoplasmático (RE). Las proteínas de la envuelta recién sintetizadas se insertan en el RE, son glicosiladas y transportadas al aparato de Golgi. Finalmente son liberadas a la membrana

de la célula hospedadora donde se ensamblan con los complejos RNPv (Lamb and Krug 1996, Sidorenko and Reichl 2004).

La formación de los RNPv tiene lugar en el núcleo de la célula hospedadora. Esto resulta de la unión de nuevas proteínas PB1, PB2, PA, NP y NS2 que se unen al ARNv. Las proteínas M1 también se unen a los RNPv, formando el complejo M1-RNPv y cataliza el transporte de éstos al citoplasma. La exportación nuclear de los RNPv también está dirigida por las proteínas NS2 y por señales de exportación nuclear (NES) presentes en la NP (Portela and Digard 2002). Las proteínas M1 también inhiben la importación de los complejos RNPv, de esta manera los nuevos RNPv asociados con M1 son incapaces de penetrar en el núcleo nuevamente.

Los complejos M1-RNPv interactúan con las colas citoplasmáticas de las proteínas M2, HA y NA, que favorecen la formación del sitio de ensamblaje en la membrana apical de las células epiteliales polarizadas. El virión se separa de la membrana celular y es liberado al medio extracelular por actividad enzimática de la NA que cliva los residuos de ácido siálico liberando así a la progenie viral. Además, muchas de las proteínas de la membrana celular son excluidas de las partículas virales por proteínas de NA. (Luo, Chung et al. 1993, Nayak, Hui et al. 2004, Nayak, Balogun et al. 2009). El modelo asume que los complejos RNPv son incorporados a los viriones al azar de manera no específica. (Bancroft and Parslow 2002).

El mecanismo de apoptosis es el más aceptado para explicar la muerte celular cuando las células son infectadas con virus Influenza, sin embargo los detalles sólo han sido elucidados experimentalmente (Olsen, Dybdahl-Sissoko et al. 1996, Schultz-Cherry and Hinshaw 1996, Schultz-Cherry, Dybdahl-Sissoko et al. 2001, Lin, Holland et al. 2002). El péptido PB1-F2 tiene localización mitocondrial y es conservado en muchos virus aviares y de mamíferos pero no ha sido identificado en virus porcinos (Chen, Calvo et al. 2001). La habilidad de un virus Influenza de promover o inhibir la apoptosis contribuye a su virulencia y la severidad de la apoptosis refleja un balance entre las actividades virales y factores celulares (Baigent and McCauley 2003).

1.2. ECOLOGÍA

1.2.1. Reservorios

Las aves acuáticas principalmente de los órdenes Anseriformes (patos y gansos) y Charadriiformes (gaviotas y aves costeras) constituyen el reservorio natural de todos los subtipos virales de Influenza A (Webster, Bean et al. 1992, Krauss, Walker et al. 2004). Estos virus han sido aislados en al menos 103 de las 144 posibles combinaciones de HA y NA (Alexander 2006, Munster, Baas et al. 2007) y en más de 88 especies de aves salvajes pertenecientes a 12 órdenes diferentes (Alexander 2000).

No hay evidencias de que el virus persista por largos períodos de tiempo en un mismo individuo por lo que se han propuesto varias hipótesis acerca de mecanismos que aseguran la perpetuación de los virus en las aves acuáticas. Entre ellos están el comportamiento migratorio de las aves, la transmisión del virus entre aves de una misma especie, la transmisión entre aves de especies diferentes y la conservación de las partículas virales por largos períodos de tiempo en ambientes acuáticos (Stallknecht, Kearney et al. 1990, Webster, Bean et al. 1992) como también en lagos congelados (Zhang, Shoham et al. 2006).

En las aves, los virus Influenza replican preferentemente en células epiteliales del tracto intestinal resultando en la excreción de altos títulos virales con las heces, aislándose directamente de éstas como de aguas contaminadas (Webster, Bean et al. 1992). Por lo que, la ruta fecal-oral es el principal mecanismo de transmisión y diseminación del virus entre aves de la misma especie o entre especies diferentes (Horimoto and Kawaoka 2001). Se han descrito también otras rutas de transmisión de virus Influenza tales como la oral-oral o la respiratoria (Sturm-Ramirez, Hulse-Post et al. 2005).

1.2.2. Prevalencia genotipos

Algunos subtipos virales son aislados más frecuentemente que otros y no todos están representados por igual en las poblaciones de aves silvestres (Krauss, Walker et al. 2004, Olsen, Munster et al. 2006, Senne, Pedersen et al. 2006, Munster, Baas et al. 2007, Wallensten, Munster et al. 2007).

Estudios recientes han demostrado que las aves costeras y las gaviotas de América son los principales precursores potenciales de virus Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) H5 y H7 (Krauss, Walker et al. 2004), mientras que en Eurasia los precursores de las formas patogénicas son usualmente los patos (Suss, Schafer et al. 1994, Munster, Wallensten et al. 2005).

Varias explicaciones tratan sobre porqué ciertos tipos de HA, de NA y combinaciones de ellas son más frecuentes en aves silvestres. Se especula que habría un balance funcional entre la afinidad de unión de la molécula de HA con la actividad enzimática de la NA (Wagner, Matrosovich et al. 2002).

En América se han detectado los 9 subtipos de NA y todas las HA a excepción de los subtipos H14 y H15 que sólo han sido aislados en Eurasia (Krauss, Obert et al. 2007). A pesar de que existe superposición en las rutas migratorias de las aves acuáticas (Kilpatrick, Chmura et al. 2006, Olsen, Munster et al. 2006), una importante cuestión que no ha sido respondida es cómo los virus IA de Eurasia se diseminan hacia América y establecen linajes en ese continente y viceversa (Krauss, Obert et al. 2007). Varios estudios han basado sus análisis en un solo gen (Makarova, Kaverin

et al. 1999, Liu, Okazaki et al. 2004, Widjaja, Krauss et al. 2004, Wallensten, Munster et al. 2005), pero ninguno a la fecha trata acerca del intercambio intercontinental que involucra a los ocho segmentos génicos. Si bien han ocurrido intercambio de genes, basados en la separación filogenética y geográfica de las dos superfamilias, la Americana y la Euroasiática, se especula que el intercambio de virus enteros podría ser un fenómeno infrecuente (Krauss, Obert et al. 2007).

1.2.3. Migración

La migración estacional de las aves silvestres es uno de los fenómenos más espectaculares de la naturaleza. Si bien no todas las especies migran, las que sí lo hacen, migrantes de corta y larga distancia, tienen oportunidades de explotar y ocupar nuevos ambientes de suministro de alimento. Las especies que residen en climas favorables viven toda su vida a pocas millas de las áreas donde se reproducen. En cambio, los migrantes de corta y los de larga distancia viajan cientos de millas o cientos de miles de millas, respectivamente, hacia los lugares de hibernación. En estos viajes extensos realizan una serie de vuelos cortos durante la noche, cuando las condiciones climáticas son más favorables, y los días son utilizados para descansar y reponer energías (Reed, Meece et al. 2003).

Las aves utilizan rutas migratorias que han sido bien establecidas (Figura 3)(Olsen, Munster et al. 2006). Sin embargo, existen numerosas variaciones que contribuyen en algunas ocasiones a tener un patrón de migración impredecible; por ejemplo, eventos climáticos extremos (Gilbert, Slingenbergh et al. 2008), una abundancia inusual de comida en nuevas localidades o la escasez de una fuente de alimento. La acción del hombre sobre el ambiente puede también incidir sobre los patrones de migración debido a la pérdida de ambientes naturales o a la creación de ambientes artificiales (Reed, Meece et al. 2003). En los continentes y a lo largo de las principales rutas migratorias los migrantes se conectan en tiempo y espacio con muchas poblaciones de aves, compartiendo áreas comunes de reproducción o de descanso (Olsen, Munster et al. 2006).

El incremento de biodiversidad puede ser ventajoso para una especie que está buscando incrementar sus fuentes de alimento y lugares de refugio, pero por otra parte, puede representar un riesgo por exponerse a nuevos individuos y patógenos. El stress que está asociado a la migración es otro factor de riesgo que incrementa la susceptibilidad de las aves a enfermedades infecciosas. En algunas aves el stress de la migración puede llevar a la reactivación de infecciones latentes. Si bien es mucho lo que debe aprenderse acerca de este fenómeno, se dispone de muchos datos acerca de los patrones de migración de muchas especies aviares (Reed, Meece et al. 2003).

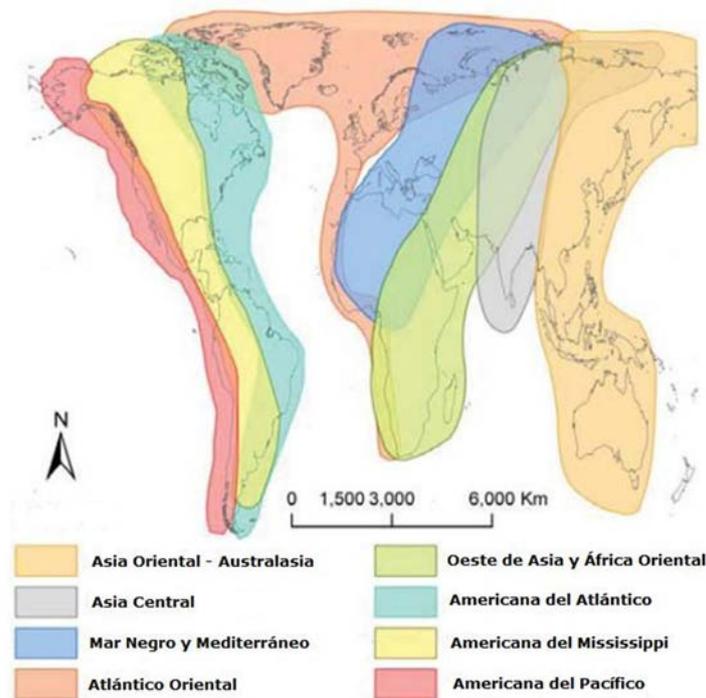


Figura 3. Principales rutas migratorias de aves acuáticas. Se indican las ocho principales rutas migratorias utilizadas por las poblaciones de aves acuáticas. Extraído y adaptado de (Si, Skidmore et al. 2009).

De un total de 450 especies de aves reconocidas en la fauna silvestre nacional, la tercera parte de ellas son migratorias. Varios factores hacen de Uruguay un país rico en aves migratorias. Su posición latitudinal intermedia entre el Ecuador y el extremo sur de Sudamérica lo coloca en plena zona de movimientos Sur-Norte, Norte-Sur de especies migrantes. A su vez, en aguas jurisdiccionales se da la confluencia de dos grandes corrientes marinas del Atlántico Sur, con un movimiento de nutrientes del que dependen importantes cadenas tróficas oceánicas, en las que las aves ocupan escalones superiores. La marcada estacionalidad del clima se acompaña de movimientos de migración en aves, que llegan escapando de los rigores invernales. Es posible hacer una clasificación primaria de los grandes movimientos de migración de aves que se dan en Uruguay, considerando la estación del año y la ocurrencia o no de reproducción en el país (Cravino 2004):

1) Migrantes estivales no nidificantes. Especies que se reproducen en el Hemisferio Norte y llegan a Uruguay como territorio de "invernada". Permanecen en territorio nacional en primavera y verano para retornar entonces a sus territorios de cría. Este grupo de especies incluye los migrantes de más larga distancia.

2) Migrantes invernales australes. Especies que se reproducen en el extremo sur del continente sudamericano: Patagonia, Tierra del Fuego, así como en Antártida, e islas oceánicas. Permanecen en territorio nacional en invierno y retornan antes del inicio de la primavera a sus territorios de cría en el sur.

3) Migrantes estivales nidificantes. Especies que se reproducen en Uruguay en los meses de primavera y verano y migran hacia el centro y

norte de Sudamérica en el otoño. Algunas especies alcanzan el sur de Norteamérica.

4) Migrantes invernales precordilleranos. Especies que se reproducen al oeste de Argentina, en ambientes cordilleranos y precordilleranos y que realizan una migración altitudinal, desplazándose en invierno a zonas más bajas. En esta dispersión estacional llegan al noreste de la provincia de Buenos Aires y en menor medida, al suroeste del territorio uruguayo, en Colonia y San José.

5) Migrantes transversales. El pato picazo, *Netta peposaca*, cumple una migración anular entre la región del Río Paraná en Santa Fé y Entre Ríos, Argentina, el Estado de Rio Grande do Sul, Brasil, y los humedales uruguayos.

6) Residentes con desplazamientos tróficos. Especies que se reproducen y cumplen todo su ciclo de vida en territorio nacional, de hábitos gregarios y dependientes de sitios de reposo nocturno colectivo. Algunos individuos de las poblaciones nacionales de estas especies traspasan regularmente fronteras en sus desplazamientos diarios.

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Los virus Influenza A están distribuidos en todo el mundo, causando infecciones sintomáticas y asintomáticas en varias especies de vertebrados, incluyendo a una amplia variedad de aves como patos, gansos, gaviotas, gallinas, codornices, pavos, faisanes, estorninos como también en suinos, caballos, ballenas, gibones, chimpancés y humanos (Webster, Bean et al. 1992).

A la fecha no existen registros del virus H5N1 de alta patogenicidad en el Nuevo Mundo. Se piensa que existen tres modos posibles de que pudieran llegar al continente si se considera a las aves como su hospedador introductorio: migración normal interhemisférica, vagrancia y las importaciones legales e ilegales de aves. Sin embargo, el rol individual de cada uno de estos mecanismos de introducción y diseminación está en debate (Chen, Smith et al. 2005, Normile 2005, Ducatez, Olinger et al. 2006, Normile 2006, Rappole and Hubalek 2006).

Muchas especies aviares domésticas y silvestres son susceptibles a la infección por los virus Influenza, pero aquellos que son patogénicos para una especie aviar pueden no serlo para otra (Alexander 1982). Estos virus se agrupan en dos clases: los de alta patogenicidad (IAAP) y los virus de baja patogenicidad (IABP) (Alexander 2000).

1.3.1. Brotes con virus de alta patogenicidad

Desde el año 1959, donde se reportó un brote provocado por un virus IAAP del subtipo H5, al año 1995, se registraron en 14 instancias brotes en aves de corral infectadas con los subtipos H5 o H7 también de alta patogenicidad (Alexander 2000).

1.3.1.1. H5N1

En marzo de 1997 en Hong Kong, se reportó un brote de virus de alta patogenicidad H5N1 en especies gallináceas (CDC 1997). El virus comenzó a diseminarse rápidamente por lo que para controlar esta situación se tuvo que sacrificar aproximadamente 1 millón y medio de las aves de corral en dicha localidad (Matrosovich, Zhou et al. 1999). A partir de mayo de ese año en la misma localidad, se infectaron varias personas con el virus IA H5N1 de las cuales el tercio murieron. Los virus aislados de estos individuos fueron idénticos a aquellos aislados en gallinas en el mismo tiempo, siendo la primera vez que un virus no adaptado en mamíferos pudo replicar en humanos (Claas, Osterhaus et al. 1998, Subbarao, Klimov et al. 1998, Bender, Hall et al. 1999). El precursor de este virus fue primeramente detectado en la provincia de Guangdong en China, que provocó la muerte a una población de gansos en 1996 (de Jong, Claas et al. 1997, Guan, Shortridge et al. 1999, Guan, Shortridge et al. 2000, Hoffmann, Stech et al. 2000, Chin, Hoffmann et al. 2002, Sims, Ellis et al. 2003).

No hay evidencia de que la transmisión con el virus H5N1 hubiera sido humano-humano, en cada uno de los casos la transmisión del virus aviar a mamíferos fue directa e independiente. Este incidente, la Gripe Aviar de 1997, demostró que la especificidad de receptor no es un factor determinante del rango de hospedador (Zhou, Shortridge et al. 1999) y que los virus aviares pueden causar enfermedad aguda en humanos sin previo reordenamiento con virus circulantes en éstos y sin ningún hospedador intermedio (Matrosovich, Zhou et al. 1999). No se reportaron más casos

humanos y el virus no ha sido detectado en aves desde que fueron sacrificadas en 1997, afortunadamente el virus no desarrolló la capacidad de transmitirse entre humanos. Sin embargo las cepas precursoras continuaron circulando durante el período 1999-2000 en las poblaciones de gansos y codornices en el sureste de China (Xu, Subbarao et al. 1999, Caughen, Swayne et al. 2000, Guan, Peiris et al. 2002, Webster, Guan et al. 2002).

Estudios moleculares de los aislamientos llevados a cabo entre febrero y mayo de 2001 identificaron seis diferentes genotipos, generados por la reasociación entre el virus de Guangdong con otros virus de aves silvestres y domésticas de diferentes subtipos identificados en los mercados. Una segunda ola de despoblación de las aves de corral en los mercados de Hong Kong en mayo de 2001 fue necesaria para erradicar los virus (Guan, Peiris et al. 2002, Li, Guan et al. 2004).

Las reasociaciones y la presión selectiva originaron que en 2002 se identificaran ocho nuevos genotipos. En diciembre de ese año se detectaron brotes de H5N1 en dos parques de Hong Kong, las especies afectadas fueron aves residentes provocando la muerte de muchas de ellas (Guan, Poon et al. 2004, Sturm-Ramirez, Ellis et al. 2004). También se detectó la cepa viral en varias especies de aves migratorias (Ellis, Bousfield et al. 2004), este es un evento raro pero con un antecedente significativo en Sudáfrica en 1961 donde la cepa H5N3 terminó con la vida de estas aves (Becker 1966).

La epidemia de Influenza aviar en el período comprendido entre diciembre de 2003 a febrero de 2004 fue de una magnitud sin precedentes, se reportaron simultáneamente brotes de H5N1 de alta patogenicidad en aves de corral en nueve países de Asia (Tiensin, Chaitaweesub et al. 2005, Alexander 2007). Se murieron cientos de millones de aves de corral principalmente especies gallináceas. En varios países, los brotes de H5N1 estuvieron confinados a las aves pero en al menos dos países el virus se transmitió a humanos y muchas de las personas infectadas murieron (Lipatov, Govorkova et al. 2004). Se piensa que la amplia transmisión del virus ocurrió cuando estas aves migratorias retornaron a sus hábitats (Sturm-Ramirez, Ellis et al. 2004).

En diciembre de 2003 durante el brote de H5N1 en Tailandia, dos tigres y dos leopardos de un zoológico en la localidad de Suphanburi mostraron síntomas clásicos de la infección y de modo inesperado todos murieron. Los felinos habían sido alimentados con carcasas frescas de pollos de un matadero local. Este es el primer reporte de infección con virus IA en felinos no domésticos (Keawcharoen, Oraveerakul et al. 2004).

En el 2004 se reportaron casos de H5N1 de alta patogenicidad en aves silvestres en Hong Kong (Alexander 2007) y en Sudáfrica se detectó la cepa viral H5N2 en avestruces sacrificándose el 40% de la población de estas aves (Sinclair, Bruckner et al. 2006).

En el período 2005-2006 el virus rápidamente se diseminó entre aves de corral del este al centro de Asia llegando a Europa y África (Chen, Smith et al. 2005, Ducatez, Olinger et al. 2006, Gilbert, Xiao et al. 2006, Weber and Stilianakis 2007). No está del todo claro si el virus fue introducido independientemente o si la diseminación estuvo asociada a aves silvestres o de corral (Alexander 2007).

Desde el 2006 se han identificado varios brotes de H5N1 en aves de corral y aves silvestres en Pakistán, en una provincia donde se encuentran alrededor del 70% de los criaderos de aves del país. En octubre de 2007 se produjo un brote de H5N1 en uno de estos criaderos; se procedió luego al

sacrificio y al enterramiento de las aves. Sólo una persona de los que realizaba estas tareas sin la adecuada protección presentó síntomas de la enfermedad. La enfermedad luego se propagó en el núcleo familiar de este individuo, y posteriormente se identificó al agente causal como un virus Influenza del subtipo H5N1. Las evidencias soportan la idea de que la transmisión inicial se produjo desde las aves de corral a humanos, y luego las transmisiones se produjeron por contacto humano-humano, ya que los demás integrantes de la familia no realizaban tareas que estuvieran en contacto directamente con las aves. A pesar de la exhaustiva investigación y de la vigilancia por parte de las autoridades sanitarias, no hubo evidencia de la transmisión a la comunidad por lo que este brote estuvo limitado al grupo familiar. La transmisión humano-humano probablemente ocurrió debido a un contacto prolongado e íntimo entre los miembros de la familia (WHO 2008).

Hasta la fecha, se han reportado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de 600 casos de infecciones humanas con la cepa H5N1 de alta patogenicidad. El primer caso en América de infección humana causada por el subtipo H5N1 ocurrió en Canadá en enero de 2014 (CDC 2014).

Millones de aves silvestres y domésticas murieron o fueron sacrificadas. Los virus IA H5N1 asiáticos muestran una variación considerable en sus genes internos a través de reordenamientos con otros virus IA y una continua evolución de los genes HA y NA (Lee, Suarez et al. 2005). El control de la diseminación de la enfermedad provocada por el virus endémico H5N1 en aves de corral puede contribuir a la reducción del riesgo para los humanos (Webster 2002), previniendo de esta manera el surgimiento de una nueva cepa viral que se transmita eficientemente y que dispere una pandemia (Li, Guan et al. 2004). Es un asunto de interés los posibles rearrreglos que puedan ocurrir entre estos virus de alta patogenicidad con el virus pandémico H1N1 que surgió en México en el 2009 y que rápidamente se transmitió entre humanos (Dawood, Jain et al. 2009).

1.3.1.2. H7

En Italia en 1878 se describió el primer brote con virus Influenza de alta patogenicidad en especies gallináceas y se denominó como "Peste aviar" (Perroncito 1878), el agente causal descrito como H7N7 fue aislado en 1902, siendo el primer registro de aislamiento del virus en aves (Horimoto and Kawaoka 2001). En 1955 se demostró que el virus de la peste aviar pertenecía al grupo de Influenza A (Schafer 1955).

En marzo de 2003 se reportó en Holanda 255 brotes de IA, el agente causal fue del subtipo H7N7 y fueron sacrificadas alrededor de 30 millones de gallinas (Koopmans, Wilbrink et al. 2004); y en 2004 se detectó un brote de IA en una granja del Valle Fraser en Columbia Británica, se ordenó el sacrificio de 1.3 millones de aves (Tweed, Skowronski et al. 2004); (Hirst, Astell et al. 2004).

1.3.2. Brotes con virus de baja patogenicidad

1.3.2.1. H5 y H7

Infecciones con virus de baja patogenicidad H5 y H7 han sido reportadas en varios países en cuatro continentes. El potencial de mutar

hacia una forma de alta patogenicidad llevó a que en los países donde fueron detectados estos subtipos virales se tomaran medidas de control para su erradicación (Alexander 2007).

A finales de 1993 y hasta 1995 en México, el subtipo viral H5N2 de baja patogenicidad afectó a varias localidades. El virus se diseminó ampliamente y a finales de 1994 y principios de 1995 se identificaron cepas H5N2 de alta patogenicidad en dos regiones de México, Puebla y Querétaro (Lee, Senne et al. 2004). Como medida para la erradicación y el control de la diseminación, entre otras medidas, se sacrificaron las parvadas infectadas y se aplicaron más de 1 billón de dosis de vacunas inactivadas y recombinantes autorizadas para su uso durante el período 1995 a 2001 (Villarreal-Chavez and Rivera-Cruz 2003, Lee, Senne et al. 2004).

De 1994 al 2004 se detectaron virus de baja patogenicidad en aves de corral, silvestres y mercados de aves vivas en Europa, Asia y en América del norte resultó en la despoblación de más de 4 millones y medio de aves, principalmente pavos (Banks, Speidel et al. 1998, Suarez, Garcia et al. 1999, Akey 2003, Spackman, Senne et al. 2003, Suarez, Spackman et al. 2003, Alexander 2007).

1.3.2.2. H9 y otros subtipos

Desde 1996 los virus del subtipo H9 han provocado brotes de enfermedad en varias especies diferentes de aves en Estados Unidos, Italia y Asia (Homme and Easterday 1970, Nardelli, Rinaldi et al. 1970, Guan, Shortridge et al. 1999, Naeem, Ullah et al. 1999, Alexander 2000, Cameron, Gregory et al. 2000, Alexander 2003).

Durante el período 2002 – 2006 se aislaron virus de baja patogenicidad en diferentes combinaciones de HA y NA en varios países de Europa, Asia, África y Oceanía. Se reportaron 21 subtipos diferentes en aves silvestres y 19 subtipos en aves de corral y otras especies cautivas. (Alexander 2007).

1.3.3. Influenza aviar en América del Sur

La vigilancia epidemiológica de aves de vuelo libre en la región es y ha sido muy limitada en el continente. La diseminación viral entre diferentes regiones varía según la prevalencia de los virus en aves silvestres acuáticas, el momento en el cual se da la migración y patrones estacionales entre otros (Spackman, McCracken et al. 2006).

En orden de proveer un análisis de riesgo de la introducción de IA en aves de corral comerciales y de traspasado más acorde a la realidad es necesario monitorear la presencia y la prevalencia de estos virus en las poblaciones de aves silvestres, como también definir los patrones espaciales y temporales de infección y determinar la diversidad de subtipos que es mantenida en la población de aves silvestres como reservorio natural (Munster, Veen et al. 2006, Brown, Luttrell et al. 2010).

1.3.3.1. Chile

En mayo de 2002 se detectó en un criadero de pollos en Chile un brote causado por el subtipo viral H7N3 de baja patogenicidad. En junio de ese año se detectó un segundo foco con el mismo subtipo viral pero de alta patogenicidad, en total murieron o fueron sacrificadas más de 465.000 aves. Luego de un estricto programa de limpieza, desinfección y

esterilización de todos los sectores afectados, Chile se declaró libre de IA (Rojas, Moreira et al. 2002, Suarez, Senne et al. 2004, Max, Herrera et al. 2007). Al analizar el área afectada, se determinó que existían cuerpos de aguas artificiales con presencia de aves silvestres, los que eran utilizados durante algunos períodos como fuente de agua para las aves comerciales. Cerca de los establecimientos afectados existen ambientes acuáticos naturales costeros, sitios utilizados por aves migratorias y costeras. Aunque no se disponen de aislados para su comparación, se postuló como hipótesis más probable que la fuente viral provino de un ave acuática silvestre debido a su baja infectividad en gallinas (Jones and Swayne 2004, Max, Herrera et al. 2007). Este brote con el subtipo H7N3 en aves comerciales de Chile en 2002 es el primer reporte de IA en Sudamérica. Los virus chilenos son genéticamente diferentes de otros virus IA reportados y se propone que representan un linaje separado que diverge de virus norteamericanos o euroasiáticos (Suarez, Senne et al. 2004).

En 2009 en cerdos, surgió la cepa H1N1 altamente transmisible que contenía combinaciones únicas de segmentos génicos provenientes de diferentes linajes suinos. El agente viral fue detectado en Norteamérica y se diseminó por todo el mundo en pocas semanas, afectando principalmente a suinos como también humanos y otros animales, esto llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar estado de pandemia (Fraser, Donnelly et al. 2009, Garten, Davis et al. 2009, OIE 2009, WHO 2009). En agosto de 2009, se reportó en un criadero de pavos en la región de Valparaíso en Chile, un brote en las aves con características similares a IA. Se subtipificó el agente como H1N1 y se encontró que las secuencias eran completamente idénticas a la cepa pandémica que circulaba en humanos. Aunque no se ha descubierto el factor que provocó que estas aves fueran el reservorio de la cepa pandémica en la región, los resultados sugieren una transmisión directa de humanos a aves (Mathieu, Moreno et al. 2010).

1.3.3.2. Bolivia

En 2001 en Bolivia, 9 meses antes del brote en Chile en 2002, se aisló el subtipo viral H7N3 de baja patogenicidad de un *Cinnamon Teal*. El análisis genético reveló que 5 de ellos, HA, NP, PA, PB1 y PB2, estaban relacionados con el virus H7N3 aislado del brote en aves en Chile confirmando la hipótesis de que este virus fue introducido por un ave silvestre. Los tres genes restantes tienen diferentes fuentes indicando un reordenamiento viral; los genes de NA y M estaban relacionados con virus de aves acuáticas silvestres norteamericanas, sugiriendo algún tipo de intercambio entre genes del virus IA de América del Norte y del Sur y el gen NS estaba más relacionado con un virus de Influenza equina proveniente de América del Sur (Spackman, Stallknecht et al. 2005, Spackman, McCracken et al. 2006, Spackman, McCracken et al. 2007).

1.3.3.3. Argentina

Durante un programa de vigilancia virológica en aves silvestres, llevado a cabo en el período 2006-2007 en Argentina, se aisló el subtipo viral H13N9 y la especie se identificó como *Kelp Gull*, una gaviota residente. La secuenciación y la caracterización filogenética de este subtipo sugieren un único linaje de genes Influenza en Sudamérica. Los segmentos genómicos internos PB2, PB1, PA, NP, M y NS están muy relacionados con

los virus IA aislados durante el brote en Chile en 2002 y con su posible ancestro aislado de un ave en Bolivia. En cambio, la glicoproteína de superficie H13 aislada ha evolucionado independientemente de otros virus H13 y el gen que codifica para la NA se mostró con más relación filogenética con virus aislados en América del Norte o en Europa (Pereda, Uhart et al. 2008). En 2008, se aisló también en Argentina el subtipo viral H1N1. El análisis filogenético demostró que los genes de HA y NA están más relacionados con virus aislados en Norteamérica. En cambio, todos los genes internos, PB1, PB2, PA, NP, M y NS se agrupan dentro del linaje Sudamericano apoyando la hipótesis de la existencia de un único linaje en la región. La filogenia de los genes PB1 y M también revela intercambio génico entre los linajes Norte y Sudamericanos, indicando una reciente cocirculación de virus de estas regiones en las poblaciones de aves migratorias (Alvarez, Mattiello et al. 2009).

Durante ese mismo período de tiempo, se colectaron 540 muestras de aves, la gran mayoría de ellas perteneciente al orden Anseriforme. El alto porcentaje de anticuerpos para el virus IA detectado en diferentes especies de patos sugiere que el mismo es endémico en la población de aves silvestres en Sudamérica (Brown, Luttrell et al. 2010).

En el período 2007 – 2010, se aislaron los subtipos H6N2 y H6N8 de 5 muestras de patos, todas ellas pertenecientes a la especie Rosy-billed pochard, *Netta peposaca*. El análisis filogenético sugirió que los genes internos están altamente relacionados con los virus IA encontrados en la región (Argentina, Bolivia y Chile). Sin embargo, el análisis de H6 reveló dos linajes diferentes en Sudamérica que han evolucionado independientemente. Un linaje contiene secuencias provenientes de Norteamérica y Oceanía y el otro está formado con secuencias de Eurasia, Norteamérica y Oceanía. Formando un único cluster en el primer linaje se agruparon 4 de las muestras identificadas como H6, sugiriendo una evolución independiente de los genes Argentinos. La secuencia restante se agrupó con el segundo linaje (Rimondi, Xu et al. 2011).

En abril de 2008, se aisló por primera vez el subtipo H1N1 en *Red-winged tinamou*, una especie silvestre terrestre no migratoria. El sitio de clivaje de la HA se correspondía con un IABP, aunque la presentación clínica y los estudios de patogenicidad indicaron que fue patogénico en la especie encontrada. Los análisis filogenéticos sugirieron que los genes de NA y HA estaban relacionados con los Norteamericanos mientras que los genes internos se los relacionó con los aislados en Sudamérica. Estos hallazgos soportan la idea de que existe un linaje filogenético Sudamericano para los genes PB2, PB1, PA, M y NS y también sugieren que los genes de NA y HA han experimentado intercambios entre las cepas de los hemisferios Norte y Sur (Alvarez, Mattiello et al. 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Investigar la presencia del virus Influenza en aves residentes y migratorias del Uruguay.

2.2. Objetivos específicos

Poner a punto la técnica de PCR para detectar parcialmente los genes conservados que codifican para las proteínas de Matriz y de Nucleoproteína del virus Influenza aviar.

Obtener la secuencia nucleotídica parcial de los genes M y NP.

Determinar las relaciones filogenéticas de las cepas de Influenza aviar detectadas con cepas que circulan en la región y el mundo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colecta de muestras

Las colectas de muestras se llevaron a cabo en diferentes Departamentos de nuestro país en el período comprendido entre febrero de 2006 y febrero de 2007.

Las muestras obtenidas de hisopados cloacales o directamente de las heces se colocaron en 1 mL de medio de transporte para virus VEAL (6,25 g de Veal Infusion Broth, 1,25 g de Albúmina bovina fracción V, 0,25 mg/mL de Gentamicina, 0,25 µg/mL de Fungizona y 0,25 mg/mL de Penicilina G en 150 mL finales) y fueron conservadas en nitrógeno líquido hasta su manipulación en el laboratorio.

3.2. Extracción de ARN total

Para la extracción del ARN total se realizó el método del Trizol® (Gibco), según las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 mL de Trizol® para 400 µL de muestra. Se homogeneizaron las muestras con vórtex aproximadamente 15 segundos. Esta primer parte de la extracción del ARN se realizó en una sala de bioseguridad nivel 2 con normas de nivel 3 (BSL2+).

A continuación se agregó 0,2 mL de Cloroformo; luego fueron centrifugadas durante 15 minutos a 4°C y 13000 r.p.m. Se alicuotó el sobrenadante acuoso, sin recoger nada de la interfase, a un tubo eppendorf estéril y se agregó 0,5 mL de Isopropanol frío. Se mezcló y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de una centrifugación de 10 minutos a 4°C y 13000 r.p.m. y descartado el sobrenadante, se añadió al pellet 1 mL de Etanol 75%. Finalmente se realizó una última centrifugación durante 2 minutos a 4°C y 13000 r.p.m. El pellet fue resuspendido en 9.5 µL de agua estéril Gibco® a 60°C y 0,5 µL de RiboLock® RNase Inhibitor (Fermentas, 40 U/µL). Las muestras se conservaron a – 80°C.

3.3. Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT/PCR)

Para la detección del ARN viral se empleó la técnica de RT-PCR. Se buscaron genes conservados: el gen que codifica para la Nucleoproteína y el gen que codifica para la proteína de Matriz.

En un primer paso se incubó 2 µL de ARN y 0,1 µg de random oligonucleótidos por 5 minutos a 70°C en un volumen final de 6 µL empleando el equipo PCR Sprint Thermal cycler (Thermo). Los pre-transcriptos fueron colocados en hielo unos segundos. A estos 6 µL le fueron incorporados 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 10 U de enzima Revertaid™ H Minus M-Mulv Reverse Transcriptase (Fermentas), 2 µL de buffer de reacción 5X (Fermentas) y 0,5 µL de Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/µL, Fermentas), totalizando 10 µL de reacción. La transcripción se llevó a cabo a 42°C durante 60 minutos seguido por 10 minutos a 70°C. El ADNc se conservó a –20°C.

En un segundo paso, 2 µL de ADNc fueron amplificados en un volumen final de 50 µL conteniendo buffer PCR 10X (Fermentas), MgCl₂ (1,5

mM), dNTPs (0,2 mM), cebadores (0,2 μ M de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, ver tabla 3) y 1,25 U de Taq Polimerasa (Fermentas). La reacción de amplificación se llevó a cabo siguiendo el ciclado que se indica a continuación. Para el gen de Nucleoproteína: 95°C, 3 minutos; 35 ciclos de (95°C, 30"; 57°C, 40"; 72°C, 40") 72°C, 10 minutos. Para el gen de Matriz: 95°C, 4 minutos; 35 ciclos de (95°C, 30"; 55°C, 40"; 72°C 50") 72°C, 10 minutos.

Cebadores		
Matriz		
Sentido	M52C	5'- CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG – 3'
Antisentido	M253R	5'- AGG GCA TTT TGG ACA AA(G/T) CGT CTA – 3'
Nucleoproteína		
Sentido	NP1200	5´ - CAG(A/G) TAC TGG GC(A/T/C)A TAA G(A/G)AC - 3´
Antisentido	NP1529	5´ - GCA TTG TCT CCG AAG AAA TAA G - 3´

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de Matriz y Nucleoproteína (Fouchier, Bestebroer et al. 2000, Lee, Chang et al. 2001)

3.4. Electroforesis

El producto amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Agarose ITM, Amresco) en buffer TBE 1X (0,89 M Tris-Borato; 0,002 M EDTA; pH 8.0) conteniendo Bromuro de Etidio (10 mg/mL) como agente intercalante. La visualización de las bandas se realizó con la exposición del gel a luz UV a través de transiluminador. Los geles fueron fotografiados con una cámara digital KODAK DC 290.

El tamaño esperado de las bandas amplificadas con los oligonucleótidos descritos en la tabla 3, es de 244 pb para M y 330 pb para NP. Se utilizó como marcador de peso molecular (PM) un ADN de 100 pb (Fermentas).

3.5. Extracción y purificación de bandas

Para aquellas muestras que fueron amplificadas; se realizó extracción y purificación de ADN a partir de los geles de agarosa utilizando el kit comercial de extracción, QIAGEN. Para este fin, se cortó el fragmento de ADN de un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X y se agregó 3 volúmenes de buffer QG a 1 volumen de gel. Para favorecer la disolución del gel se incubó durante 10 minutos a 56°C. Luego de chequear que el color de la muestra fuera amarillo, se agregó un volumen de Isopropanol y se mezcló. Se colocó la muestra en una columna de filtración provista por el kit y se centrifugó 1 minuto a 13000 r.p.m. Luego de agregar 0,5 mL de buffer QG a la columna se realizó una centrifugación durante 1 minuto a 13000 r.p.m. Para lavar se agregó 0,75 mL del buffer PE a la columna y se centrifugó 1 minuto a 13000 r.p.m. Se descartó el eluido y se centrifugó 1 minuto adicional a 13000 r.p.m. Se colocó la columna en un tubo eppendorf estéril y se eluyó el ADN con 30 μ L de Agua estéril Gibco[®] centrifugando durante 1 minuto a 13000 r.p.m.

3.6. Clonación, transformación bacteriana, preparación de minicultivos y minipreps

Este procedimiento fue empleado para aumentar la cantidad de ADN presente en el producto de PCR cuando se utilizaron los primers de Matriz y así poder secuenciar el fragmento amplificado.

3.6.1. Clonación

En una primera etapa se clonó el producto de PCR utilizando GeneJet™ PCR cloning kit (Fermentas), según las instrucciones del fabricante. Se preparó una reacción compuesta por: Buffer de reacción (1X), 2 µL del producto de PCR, 1 µL de la enzima DNA blunting y Agua libre de ARNasa Gibco®. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 70°C. Luego se colocó en hielo por unos segundos, se agregó 5 U de T4 DNA ligasa y 50 ng de pJet1/blunt cloning vector. Finalmente se incubó a 22°C durante 30 minutos.

3.6.2. Transformación

Se descongelaron en hielo las células competentes NEB 5-alpha Competent E.coli (New England Biolabs). Se hicieron alícuotas de 25 µl en tubos eppendorf y se agregó 2,5 µL de la mezcla de ligación. Se incubó en hielo durante 30 minutos y luego se las sometió a un shock térmico durante 30 segundos a 42°C. Tras 5 minutos en hielo, se agregó 425 µL de SOC (provisto por el kit comercial) a temperatura ambiente. Se agitó una hora a 37 °C y se sembró en placa con LB agar.

3.6.3. Screening – PCR M

Para detectar si las colonias bacterianas incorporaron el plásmido con el fragmento en estudio, se realizó una PCR utilizando como molde una colonia y los mismos reactivos y ciclados utilizados para amplificar el gen de Matriz. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X conteniendo Bromuro de Etidio (10 mg/mL) como agente intercalante.

Para aquellas colonias que fueron amplificadas se procedió de la siguiente manera.

3.6.4. Minicultivos y minipreps

Se picó una colonia y se agregó a un tubo conteniendo 3 mL de medio LB (Bacto triptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5 g/L, NaCl 10g/L) y 3 µL de Ampicilina (100 mg/µL). Se incubaron los tubos toda la noche a 37°C con agitación a 180 r.p.m.

Para los minicultivos que presentaron crecimiento bacteriano, se realizaron minipreps utilizando el kit Nucleospin® Plasmid Quick Pure (Macherey Nagel) según las instrucciones del fabricante.

Se sembraron las muestras en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Los clones positivos fueron almacenados en glicerol al 25% en freezer de -80°C.

3.7. Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos de PCR del gen NP purificados y los minicultivos conteniendo al gen de M, fueron enviados a un servicio tercerizado de secuenciación automática; MacroGen, Korea.

Las secuencias de ADN fueron analizadas utilizando el programa Bioedit (Clustal W) (Hall 1999) y MEGA versión 4.0.2. (Tamura, Dudley et al. 2007).

4. RESULTADOS

4.1. Colecta de muestras

Se colectaron 113 muestras de aves que incluían a 23 especies residentes y 90 especies visitantes, en los departamentos de Paysandú, Salto, San José y Rocha (Ver tabla 4).

ORDEN	Nombre Científico	Nombre común	Muestras	Estatus*	Lugar Captura
Anseriformes	<i>Amazonetta brasiliensis</i>	Pato Brasileiro	1	R	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Bartramia longicauda</i>	Batitú	4	VV	Camino entre ruta 26 y ruta 31 (Paysandú/Salto)
Charadriiformes	<i>Calidris fuscicollis</i>	Playerito Rabadilla Blanca	31	VV	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Charadrius falklandicus</i>	Chorlito Doble Collar	5	VI	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Charadrius modestus</i>	Chorlito Pecho Canela	8	VI	Barra de la laguna Rocha/Playa Penino (San José)
Charadriiformes	<i>Charadrius semipalmatus</i>	Chorlito Palmado	1	VV	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Gallinago paraquiae</i>	Becasina	3	R	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Himantopus mexicanus</i>	Tero Real	1	R	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Nycticryphes semicollaris</i>	Aguatero	1	R	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Pluvialis dominica</i>	Chorlo Dorado	23	VV	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Rinchoris niger</i>	Rayador	14	R	Playa Penino (San José)
Charadriiformes	<i>Sterna hirundinacea</i>	Gaviotín Sudamericano	11	VI	Barra de la laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Tringa flavipes</i>	Playero Patas Amarillas Chico	2	VV	Camino entre ruta 26 y ruta 31 (Salto)/Barra Laguna Rocha
Charadriiformes	<i>Tryngites subruficollis</i>	Playerito Canela	4	VV	Barra de la Laguna de Rocha
Ciconiiformes	<i>Ardea cocoi</i>	Garza Mora	1	R	Barra de la Laguna de Rocha
Falconiformes	<i>Buteo albicaudatus</i>	Águila Cola Blanca	1	RV	Camino entre ruta 26 y ruta 31 (Arroyo Guayabos - Salto)
Falconiformes	<i>Buteo albicaudatus</i>	Chimango	1	RV	Camino entre ruta 26 y ruta 31 (Arroyo Guayabos - Salto)
Procellariiformes	<i>Pterodroma incerta</i>	Petrel Cabeza Parda	1	VV	Playa Aguada (Rocha)

Tabla 4. Descripción de las aves muestreadas. *Estatus (VV: visitante de verano, VI= visitante de invierno, R= residente, RV= residente de verano).

4.2. Amplificación del ARN por RT/PCR

Solamente para una de las 113 muestras perteneciente a la especie *Calidris fuscicollis*, se lograron amplificar 244 pb correspondientes a parte de la secuencia nucleotídica del gen de M y 330 pb correspondientes a parte de la secuencia nucleotídica del gen de NP (Figura 6).

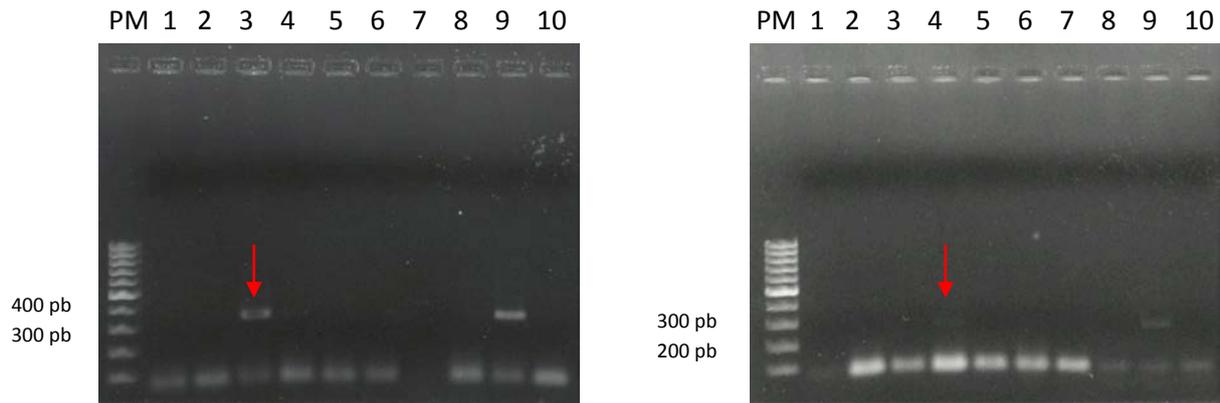


Figura 6. Amplificación de los segmentos 5 y 7 del virus Influenza aviar

Izquierda. Amplificación con primers de NP. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb Fermentas, 1-8: muestras en estudio, 3: muestra positiva, 9: control positivo (H1N1 humano), 10: control negativo H₂O Gibco®.

Derecha. Amplificación con primers de M. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb Fermentas, 1-8: muestras en estudio, 4: muestra positiva, 9: control positivo (H1N1 humano), 10: control negativo H₂O Gibco®.

4.3. Alineamiento de secuencias nucleotídicas y análisis filogenético

Para el análisis filogenético se utilizaron las secuencias amplificadas de los genes de M y de NP. Estas secuencias al ser muy conservadas permiten comparar con otras secuencias de M y NP de diferentes subtipos de Influenza A. Para la confección de los árboles filogenéticos, se eligieron secuencias de diferentes regiones, subtipos y hospedadores.

Las secuencias nucleotídicas de las muestras analizadas fueron editadas y alineadas con el programa Bioedit (Clustal W).

La muestra positiva presentó una homología del 97% para ambos segmentos amplificadas con las secuencias aviares obtenidas del Genbank (Tabla 5).

Matriz		
Nº Acceso	Secuencia nucleotídica	% *
GU053514.1	A/mallard/Maryland/324/2003 (H2N3)	97
GU053164.1	A/Turkey/Minnesota/38429/1988 (H7N9)	97
GU053158.1	A/duck/Victoria/9003-09-1400/1976 (H7N7)	97
GU053039.1	A/chicken/Chile/184240-1/2002 (H7N3)	97
GU053024.1	A/chicken/Canada/314514-2/2005 (H7N3)	97
GU186603.1	A/chicken/Canada/314514-1/2005 (H7N3)	97
CY034759.1	A/mallard/Italy/4223-2/2006 (H5N2)	97
AB370203.2	A/duck/Hokkaido/1019/2001 (H4N6)	97
CY022638.1	A/teal/Italy/3931-38/2005 (H5N2)	97
CY020878.1	A/pintail/Alaska/49/2005 (H3N8)	97
CY016181.1	A/pintail/Alaska/211/2005 (H3N8)	97
CY015493.1	A/mallard/Alaska/256/2005 (H3N8)	97
CY015028.1	A/chicken/Chile/184240-4322/2002 (H7N3)	97
AY611525.1	A/chicken/British Columbia/04 (H7N3)	97
AY303657.1	A/turkey/Chile/4418/02 (H7N3)	97
AY303656.1	A/chicken/Chile/4977/02 (H7N3)	97
Nucleoproteína		
Nº Acceso	Secuencia nucleotídica	% *
CY016159.1	A/gadwall/Ohio/37/1999 (H6N2)	97
GU051919.1	A/chicken/New Jersey/15906-9/1996	97
GU051325.1	A/mallard/Minnesota/410/2000 (H5N2)	97
GU051310.1	A/mallard/Minnesota/166/2000 (H5N2)	97
FJ357072.1	A/mallard/MN/1/2000 (H5N2)	97
CY013266.1	A/pintail/Alaska/53/2005 (H3N6)	97
GU051259.1	A/mallard/Minnesota/168/1999 (H4N8)	97
FJ686725.1	A/mallard/Ohio/363/2003 (H2N1)	97
EU743049.1	A/pheasant/NJ/1355/1998 (H5N2)	97
EU742631.1	A/pheasant/NJ/9804566/1998 (H5N2)	97
CY020880.1	A/pintail/Alaska/49/2005 (H3N8)	97
CY016414.1	A/mallard/Alaska/715/2005 (H3N8)	97
CY015503.1	A/pintail/Alaska/279/2005 (H3N8)	97
CY015495.1	A/mallard/Alaska/256/2005 (H3N8)	97
CY014875.1	A/black duck/NJ/184/1988 (H5N2)	97
AY633343.1	A/pintail/Alberta/156/97 (H3N8)	97

Tabla 5. Comparación de las secuencias de los segmentos génicos individuales de la muestra positiva con secuencias obtenidos del Genbank

*El símbolo % indica el porcentaje de homología de las secuencias nucleotídicas en estudio con las de referencia.

En la filogenia del gen M las secuencias se agruparon en dos linajes aviares asociados a regiones geográficas, linaje aviar Americano y el linaje aviar Euroasiático (Figura 7). Mientras que para el gen NP las secuencias se distribuyeron en cinco linajes diferentes representando tres de ellos a linajes aviares asociados a una determinada región geográfica y los otros

dos linajes representan a un linaje hospedador-específico. Linaje Equino, Linaje Suino y Linajes aviáres: Norteamericano, Sudamericano y Euroasiático (Figura 8).

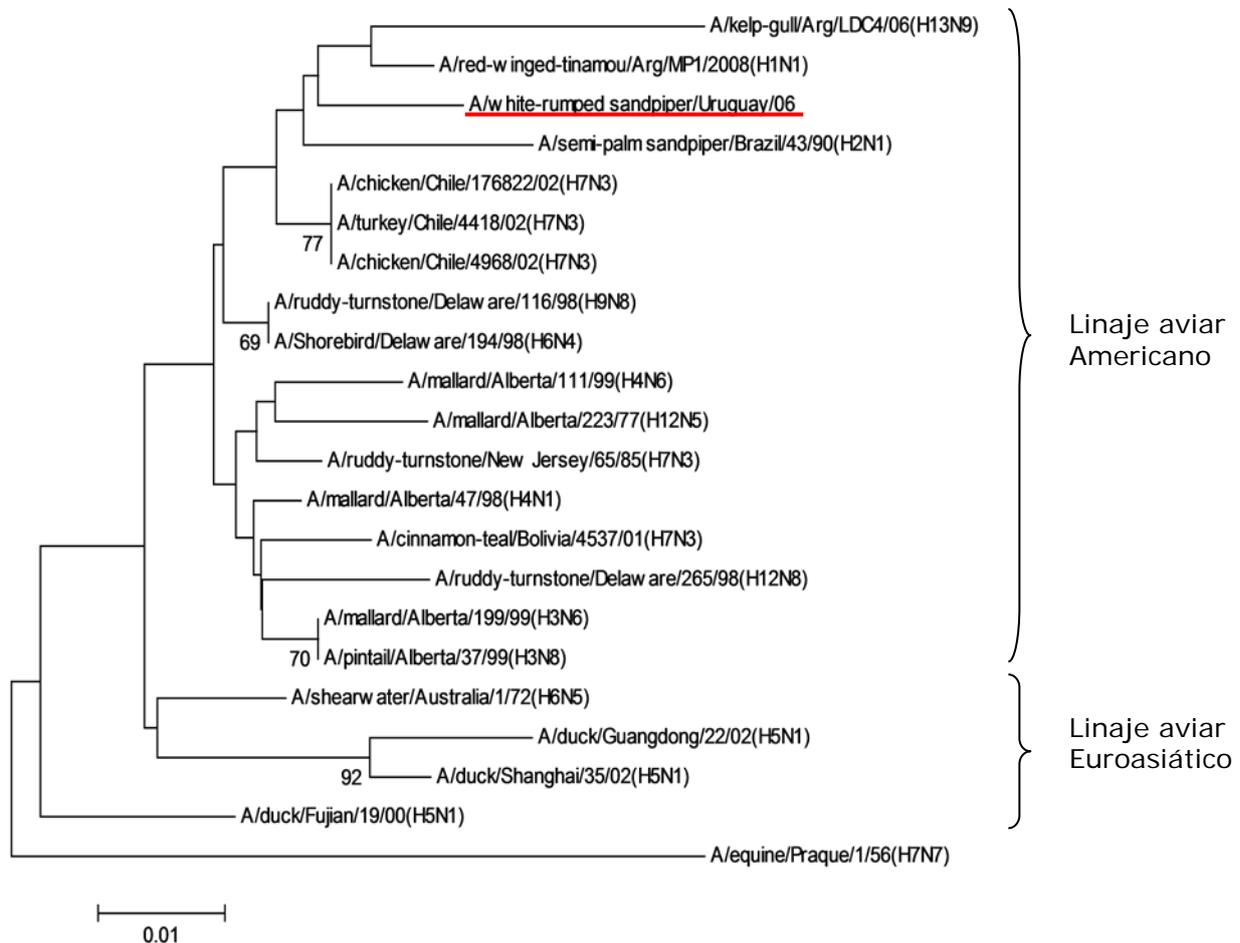


Figura 7. Árbol filogenético para la secuencia nucleotídica de la proteína Matriz. Se indican los linajes asociados a regiones geográficas. El análisis se realizó con el programa Mega 4.0.2 por el método de Neighbor-Joining (bootstrap 500 réplicas). Se indican valores de bootstrap por encima del 60%. La secuencia subrayada corresponde a la amplificada en este trabajo. El árbol tiene como raíz la secuencia: A/equine/Prague/1/56(H7N7).

La secuencia de la muestra positiva *Calidris fuscicollis* de Rocha se agrupa dentro del linaje aviar Americano y está muy relacionada con secuencias aisladas en la región, con un rango de homología del 97%. Los genes que fueron aislados en un brote en aves de corral en Chile en el 2002 (Suarez, Senne et al. 2004), están relacionados con la secuencia en estudio pero se agrupan en una rama separada en la filogenia.

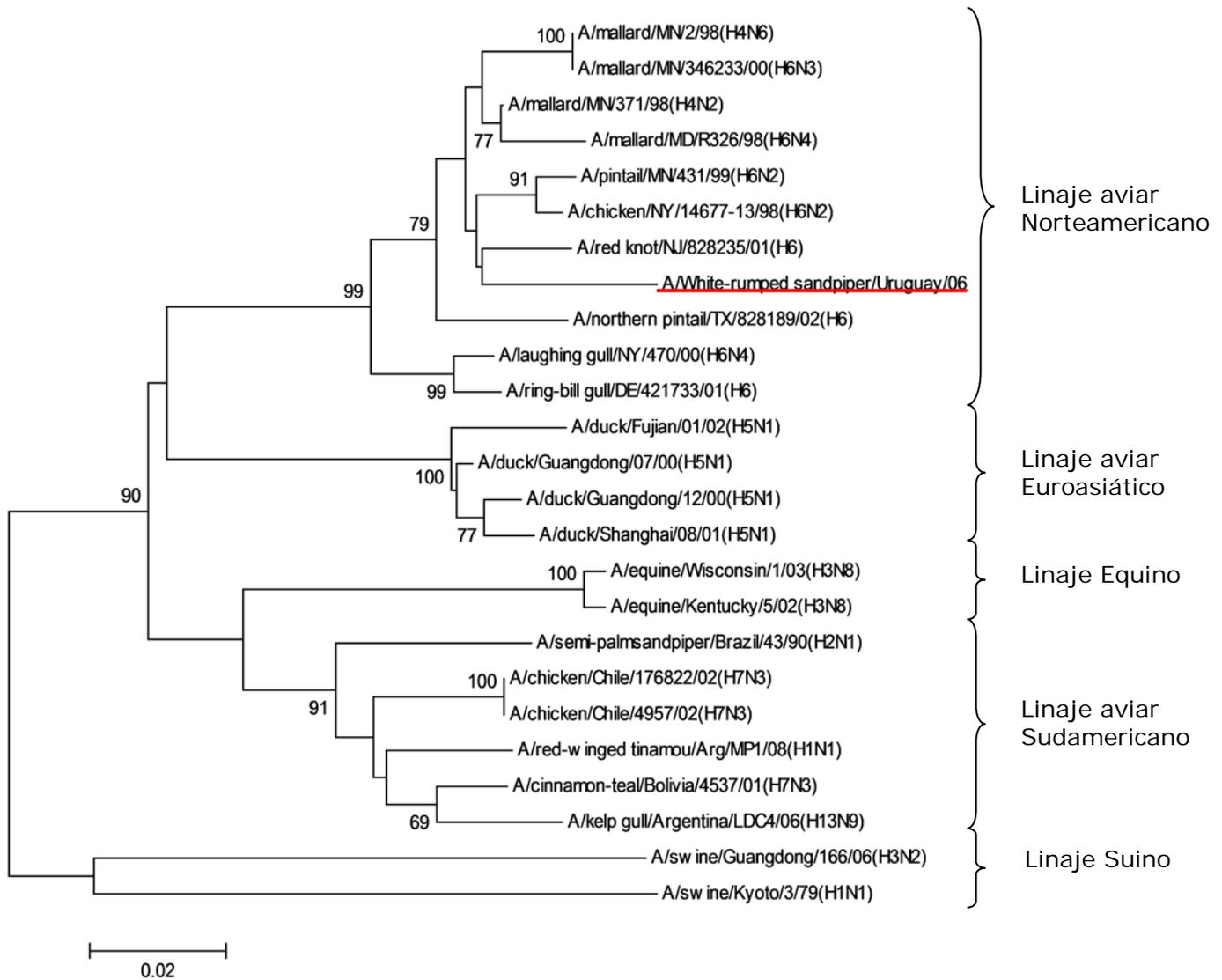


Figura 8. Árbol filogenético para la secuencia nucleotídica de Nucleoproteína. Se indican linajes asociados a regiones geográficas u hospedadores. El análisis se realizó con el programa Mega 4.0.2 por el método de Neighbor-Joining (bootstrap 500 réplicas). Se indican valores de bootstrap por encima del 60%. La secuencia subrayada corresponde a la amplificada en este trabajo.

La secuencia nucleotídica de NP amplificada en este trabajo se agrupa con genes aviarios Norteamericanos, esto sugiere intercambio de genes virales que circulan en los hemisferios Norte y Sur. Además la secuencia diverge de las aisladas en la región (Argentina, Bolivia, Brasil y Chile). Estas secuencias del linaje aviar Sudamericano están muy relacionadas y tienen un antecesor en común.

5. DISCUSIÓN

Uruguay está localizado entre los corredores utilizados por muchas especies aviares migradoras neoárticas y neotropicales, que aparecen en el país durante su período no reproductivo. La muestra positiva para M y NP fue obtenida de un ave capturada en la laguna de Rocha. Esta laguna cubre un área de 7200 hectáreas y está situada al Sureste del Uruguay separada del Océano Atlántico por una barra arenosa (Figura 9). El ave pertenece a la especie *Calidris fuscicollis*, un migrador de largo alcance que nidifica en el Ártico de Norteamérica e hiberna al noroeste de Sudamérica. Esta ave más conocida como Playerito rabadilla blanca es una de las aves costeras más abundantes de la laguna y se ha observado su presencia en todos los meses del año excepto en el mes de julio (Harrington, Leeuwenberg et al. 1991, Alfaro and Clara 2007).

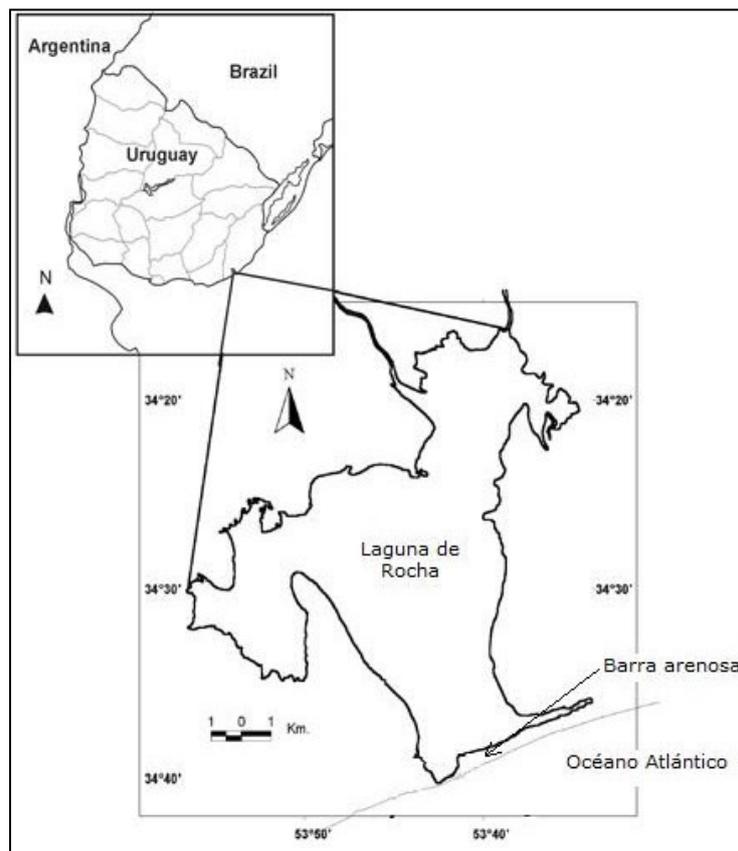


Figura 9. Laguna de Rocha ubicada en el departamento de Rocha, Uruguay. Extraída y modificada de (Alfaro and Clara 2007).

Las secuencias amplificadas forman parte de diferentes linajes dependiendo del gen que se esté considerando en la filogenia. La secuencia del gen M se agrupa dentro del linaje aviar Americano y se encuentra relacionada filogenéticamente con las que circulan en la región, excepto la aislada en Bolivia que se agrupa con las secuencias aviares Norteamericanas (Figura 7). La secuencia del gen NP se encuentra alejada del cluster aviar Sudamericano donde están agrupadas todas las secuencias aisladas en la región (Argentina, Bolivia, Brasil y Chile) y se agrupa dentro del linaje aviar Norteamericano, sugiriendo un posible intercambio de genes entre aves del norte y del sur de América (Figura 8).

Los resultados son consistentes con la ruta migratoria de esta especie y además la congregación de diferentes especies aviares residentes y migratorias en la Laguna de Rocha que a un mismo tiempo favorece la transmisión del virus Influenza.

En este trabajo se logró amplificar por primera vez genoma del virus Influenza en aves en Uruguay. A pesar de la importancia de la ecología de los virus Influenza sobre el impacto que tienen en la industria comercial y para nuestro conocimiento en la salud humana y animal, la vigilancia en aves silvestres en América del Sur es mínima. La secuenciación y la caracterización filogenética del virus Influenza A en la región que ha tenido lugar en estos últimos años, sugiere la presencia de linajes únicos en Sudamérica para los genes internos: PB1, PB2, PA, NP, M y NS. (Suarez, Senne et al. 2004, Spackman, McCracken et al. 2006, Pereda, Uhart et al. 2008, Alvarez, Mattiello et al. 2009).

Por lo tanto, la vigilancia de los virus Influenza en aves acuáticas se hace necesaria para disponer de información de los subtipos que pudieran estar circulando en la población a fin de prevenir brotes en especies silvestres y subsecuentemente en aves domésticas y el hombre.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akey, B. L. (2003). "Low-pathogenicity H7N2 avian influenza outbreak in Virginia during 2002." *Avian Dis* 47(3 Suppl): 1099-1103.
- Alexander, D. J. (1982). "Isolation of influenza A viruses from birds in Great Britain during 1980 and 1981." *Vet Rec* 111(14): 319-321.
- Alexander, D. J. (2000). "A review of avian influenza in different bird species." *Vet Microbiol* 74(1-2): 3-13.
- Alexander, D. J. (2003). "Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997-2002." *Avian Dis* 47(3 Suppl): 792-797.
- Alexander, D. J. (2006). "Avian influenza viruses and human health." *Dev Biol (Basel)* 124: 77-84.
- Alexander, D. J. (2007). "Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006." *Avian Dis* 51(1 Suppl): 161-166.
- Alfaro, M. and M. Clara (2007). "Assemblage of shorebird and seabirds on Rocha lagoon sandbar, Uruguay." *Ornitologia Neotropical*.(18): 421-432.
- Alvarez, P., R. Mattiello, P. Rivaller, A. Pereda, C. T. Davis, L. Boado, E. D'Ambrosio, S. Aguirre, C. Espinosa, J. La Torre, R. Donis and N. Mattion (2009). "First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina." *Virology* 396(1): 76-84.
- Alvarez, P., R. Mattiello, P. Rivaller, A. Pereda, C. T. Davis, L. Boado, E. D'Ambrosio, S. Aguirre, C. Espinosa, J. La Torre, R. Donis and N. Mattion (2010). "First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina." *Virology* 396(1): 76-84.
- Amorim, M. J. and P. Digard (2006). "Influenza A virus and the cell nucleus." *Vaccine* 24(44-46): 6651-6655.
- Baigent, S. J. and J. W. McCauley (2003). "Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission." *Bioessays* 25(7): 657-671.
- Bancroft, C. T. and T. G. Parslow (2002). "Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome." *J Virol* 76(14): 7133-7139.
- Banks, J., E. Speidel and D. J. Alexander (1998). "Characterisation of an avian influenza A virus isolated from a human--is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses?" *Arch Virol* 143(4): 781-787.
- Becker, W. B. (1966). "The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961." *J Hyg (Lond)* 64(3): 309-320.
- Bender, C., H. Hall, J. Huang, A. Klimov, N. Cox, A. Hay, V. Gregory, K. Cameron, W. Lim and K. Subbarao (1999). "Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998." *Virology* 254(1): 115-123.
- Bentz, J. and A. Mittal (2003). "Architecture of the influenza hemagglutinin membrane fusion site." *Biochim Biophys Acta* 1614(1): 24-35.

- Brown, J. D., M. P. Luttrell, M. M. Uhart, H. del Valle Ferreyra, M. M. Romano, M. V. Rago and D. E. Stallknecht (2010). "Antibodies to type A influenza virus in wild waterbirds from Argentina." *J Wildl Dis* 46(3): 1040-1045.
- Bullough, P. A., F. M. Hughson, J. J. Skehel and D. C. Wiley (1994). "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." *Nature* 371(6492): 37-43.
- Cameron, K. R., V. Gregory, J. Banks, I. H. Brown, D. J. Alexander, A. J. Hay and Y. P. Lin (2000). "H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in Pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong." *Virology* 278(1): 36-41.
- Cauthen, A. N., D. E. Swayne, S. Schultz-Cherry, M. L. Perdue and D. L. Suarez (2000). "Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans." *J Virol* 74(14): 6592-6599.
- CDC (1997). "Isolation of avian influenza A (H5N1) from humans - Hong Kong, May-December, 1997." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46(46): 1204-1207.
- CDC (2014). "Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) in People."
- Claas, E. C., A. D. Osterhaus, R. van Beek, J. C. De Jong, G. F. Rimmelzwaan, D. A. Senne, S. Krauss, K. F. Shortridge and R. G. Webster (1998). "Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus." *Lancet* 351(9101): 472-477.
- Coloma, R., J. M. Valpuesta, R. Arranz, J. L. Carrascosa, J. Ortin and J. Martin-Benito (2009). "The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex." *PLoS Pathog* 5(6): e1000491.
- Compans, R. W., J. Content and P. H. Duesberg (1972). "Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus." *J Virol* 10(4): 795-800.
- Cravino, J. L. (2004). MGAP. Dirección General de Servicios Ganaderos. División Sanidad Animal. Departamento de Programas Sanitarios. Dirección de Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino". Plan de Contingencia en Influenza aviar. Anexo IV. Pautas generales sobre el monitoreo de aves migratorias como parte de un programa de vigilancia epizootiológica. .
- Chen, H., G. J. Smith, S. Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K. S. Li, R. G. Webster, J. S. Peiris and Y. Guan (2005). "Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl." *Nature* 436(7048): 191-192.
- Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." *Nat Med* 7(12): 1306-1312.
- Chin, P. S., E. Hoffmann, R. Webby, R. G. Webster, Y. Guan, M. Peiris and K. F. Shortridge (2002). "Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry." *J Virol* 76(2): 507-516.
- Dawood, F. S., S. Jain, L. Finelli, M. W. Shaw, S. Lindstrom, R. J. Garten, L. V. Gubareva, X. Xu, C. B. Bridges and T. M. Uyeki (2009). "Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans." *N Engl J Med* 360(25): 2605-2615.

- de Jong, J., E. Claas, A. Osterhaus, R. Webster and W. L. Lim (1997). "A pandemic warning?" *Nature* 389(6651): 554.
- Desselberger, U., V. R. Racaniello, J. J. Zazra and P. Palese (1980). "The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity." *Gene* 8(3): 315-328.
- Ducatez, M. F., C. M. Olinger, A. A. Owoade, S. De Landtsheer, W. Ammerlaan, H. G. Niesters, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier and C. P. Muller (2006). "Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria." *Nature* 442(7098): 37.
- Ellis, T. M., R. B. Bousfield, L. A. Bissett, K. C. Dyrting, G. S. Luk, S. T. Tsim, K. Sturm-Ramirez, R. G. Webster, Y. Guan and J. S. Malik Peiris (2004). "Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002." *Avian Pathol* 33(5): 492-505.
- Fouchier, R. A., T. M. Bestebroer, S. Herfst, L. Van Der Kemp, G. F. Rimmelzwaan and A. D. Osterhaus (2000). "Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene." *J Clin Microbiol* 38(11): 4096-4101.
- Fouchier, R. A., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen and A. D. Osterhaus (2005). "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls." *J Virol* 79(5): 2814-2822.
- Fraser, C., C. A. Donnelly, S. Cauchemez, W. P. Hanage, M. D. Van Kerkhove, T. D. Hollingsworth, J. Griffin, R. F. Baggaley, H. E. Jenkins, E. J. Lyons, T. Jombart, W. R. Hinsley, N. C. Grassly, F. Balloux, A. C. Ghani, N. M. Ferguson, A. Rambaut, O. G. Pybus, H. Lopez-Gatell, C. M. Alpuche-Aranda, I. B. Chapela, E. P. Zavala, D. M. Guevara, F. Checchi, E. Garcia, S. Hugonnet and C. Roth (2009). "Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings." *Science* 324(5934): 1557-1561.
- Garten, R. J., C. T. Davis, C. A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W. M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C. B. Smith, S. L. Emery, M. J. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf, D. F. Burke, R. A. Fouchier, C. Pappas, C. M. Alpuche-Aranda, H. Lopez-Gatell, H. Olivera, I. Lopez, C. A. Myers, D. Faix, P. J. Blair, C. Yu, K. M. Keene, P. D. Dotson, Jr., D. Boxrud, A. R. Sambol, S. H. Abid, K. St George, T. Bannerman, A. L. Moore, D. J. Stringer, P. Blevins, G. J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H. F. Guevara, E. A. Belongia, P. A. Clark, S. T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C. B. Bridges, M. Shaw, D. B. Jernigan, T. M. Uyeki, D. J. Smith, A. I. Klimov and N. J. Cox (2009). "Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans." *Science* 325(5937): 197-201.
- Gilbert, M., J. Slingenbergh and X. Xiao (2008). "Climate change and avian influenza." *Rev Sci Tech* 27(2): 459-466.
- Gilbert, M., X. Xiao, J. Domenech, J. Lubroth, V. Martin and J. Slingenbergh (2006). "Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus." *Emerg Infect Dis* 12(11): 1650-1656.

- Guan, Y., J. S. Peiris, A. S. Lipatov, T. M. Ellis, K. C. Dyrting, S. Krauss, L. J. Zhang, R. G. Webster and K. F. Shortridge (2002). "Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8950-8955.
- Guan, Y., L. L. Poon, C. Y. Cheung, T. M. Ellis, W. Lim, A. S. Lipatov, K. H. Chan, K. M. Sturm-Ramirez, C. L. Cheung, Y. H. Leung, K. Y. Yuen, R. G. Webster and J. S. Peiris (2004). "H5N1 influenza: a protean pandemic threat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8156-8161.
- Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss, P. S. Chin, K. C. Dyrting, T. M. Ellis, R. G. Webster and M. Peiris (2000). "H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China." *J Virol* 74(20): 9372-9380.
- Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss and R. G. Webster (1999). "Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9363-9367.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl. Acids. Symp. Ser.*(41): 95-98.
- Harrington, B., F. Leeuwenberg, S. Resende, R. McNeil, B. Thomas, J. Grear and E. Martinez (1991). "Migration and mass change of White-rumped sandpipers in north and south America." *Wilson Bull.* 103(4): 621-636.
- Heinen, P. (2002). "Swine influenza: a zoonosis." *Veterinary Sciences Tomorrow*: 1-10.
- Hinshaw, V. S., G. M. Air, A. J. Gibbs, L. Graves, B. Prescott and D. Karunakaran (1982). "Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls." *J Virol* 42(3): 865-872.
- Hirst, M., C. R. Astell, M. Griffith, S. M. Coughlin, M. Moksa, T. Zeng, D. E. Smailus, R. A. Holt, S. Jones, M. A. Marra, M. Petric, M. Krajden, D. Lawrence, A. Mak, R. Chow, D. M. Skowronski, S. A. Tweed, S. Goh, R. C. Brunham, J. Robinson, V. Bowes, K. Sojonky, S. K. Byrne, Y. Li, D. Kobasa, T. Booth and M. Paetzel (2004). "Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia." *Emerg Infect Dis* 10(12): 2192-2195.
- Hoffmann, E., J. Stech, I. Leneva, S. Krauss, C. Scholtissek, P. S. Chin, M. Peiris, K. F. Shortridge and R. G. Webster (2000). "Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1?" *J Virol* 74(14): 6309-6315.
- Homme, P. J. and B. C. Easterday (1970). "Avian influenza virus infections. 3. Antibody response by turkeys to influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus." *Avian Dis* 14(2): 277-284.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka (2001). "Pandemic threat posed by avian influenza A viruses." *Clin Microbiol Rev* 14(1): 129-149.
- Jones, Y. L. and D. E. Swayne (2004). "Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chickens." *Avian Dis* 48(1): 119-128.
- Kawaoka, Y., S. Yamnikova, T. M. Chambers, D. K. Lvov and R. G. Webster (1990). "Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus." *Virology* 179(2): 759-767.
- Keawcharoen, J., K. Oraveerakul, T. Kuiken, R. A. Fouchier, A. Amonsin, S. Payungporn, S. Noppornpanth, S. Wattanodorn, A. Theambooniers, R. Tantilertcharoen, R. Pattanarangsarn,

- N. Arya, P. Ratanakorn, D. M. Osterhaus and Y. Poovorawan (2004). "Avian influenza H5N1 in tigers and leopards." *Emerg Infect Dis* 10(12): 2189-2191.
- Kilbourne, E. D. (1963). "Influenza." *Med Sci* 13: 527-540.
- Kilpatrick, A. M., A. A. Chmura, D. W. Gibbons, R. C. Fleischer, P. P. Marra and P. Daszak (2006). "Predicting the global spread of H5N1 avian influenza." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(51): 19368-19373.
- Koopmans, M., B. Wilbrink, M. Conyn, G. Natrop, H. van der Nat, H. Vennema, A. Meijer, J. van Steenberghe, R. Fouchier, A. Osterhaus and A. Bosman (2004). "Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands." *Lancet* 363(9409): 587-593.
- Krauss, S., C. A. Obert, J. Franks, D. Walker, K. Jones, P. Seiler, L. Niles, S. P. Pryor, J. C. Obenauer, C. W. Naeve, L. Widjaja, R. J. Webby and R. G. Webster (2007). "Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange." *PLoS Pathog* 3(11): e167.
- Krauss, S., D. Walker, S. P. Pryor, L. Niles, L. Chenghong, V. S. Hinshaw and R. G. Webster (2004). "Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America." *Vector Borne Zoonotic Dis* 4(3): 177-189.
- Lakadamyali, M., M. J. Rust and X. Zhuang (2004). "Endocytosis of influenza viruses." *Microbes Infect* 6(10): 929-936.
- Lamb, R. A. and R. M. Krug, Eds. (1996). *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia
- Edited by Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.
- Lee, C. W., D. A. Senne and D. L. Suarez (2004). "Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus." *J Virol* 78(15): 8372-8381.
- Lee, C. W., D. L. Suarez, T. M. Tumpey, H. W. Sung, Y. K. Kwon, Y. J. Lee, J. G. Choi, S. J. Joh, M. C. Kim, E. K. Lee, J. M. Park, X. Lu, J. M. Katz, E. Spackman, D. E. Swayne and J. H. Kim (2005). "Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea." *J Virol* 79(6): 3692-3702.
- Lee, M. S., P. C. Chang, J. H. Shien, M. C. Cheng and H. K. Shieh (2001). "Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR." *J Virol Methods* 97(1-2): 13-22.
- Li, K. S., Y. Guan, J. Wang, G. J. Smith, K. M. Xu, L. Duan, A. P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. T. Estoepangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H. T. Long, N. T. Hanh, R. J. Webby, L. L. Poon, H. Chen, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, R. G. Webster and J. S. Peiris (2004). "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia." *Nature* 430(6996): 209-213.
- Lin, C., R. E. Holland, Jr., J. C. Donofrio, M. H. McCoy, L. R. Tudor and T. M. Chambers (2002). "Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death." *Vet Microbiol* 84(4): 357-365.
- Lipatov, A. S., E. A. Govorkova, R. J. Webby, H. Ozaki, M. Peiris, Y. Guan, L. Poon and R. G. Webster (2004). "Influenza: emergence and control." *J Virol* 78(17): 8951-8959.

- Liu, J. H., K. Okazaki, G. R. Bai, W. M. Shi, A. Mweene and H. Kida (2004). "Interregional transmission of the internal protein genes of H2 influenza virus in migratory ducks from North America to Eurasia." *Virus Genes* 29(1): 81-86.
- Luo, G., J. Chung and P. Palese (1993). "Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: deletions and insertions." *Virus Res* 29(2): 141-153.
- Makarova, N. V., N. V. Kaverin, S. Krauss, D. Senne and R. G. Webster (1999). "Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America." *J Gen Virol* 80 (Pt 12): 3167-3171.
- Mathieu, C., V. Moreno, P. Retamal, A. Gonzalez, A. Rivera, J. Fuller, C. Jara, C. Lecocq, M. Rojas, A. Garcia, M. Vasquez, M. Agredo, C. Gutierrez, H. Escobar, R. Fasce, J. Mora, J. Garcia, J. Fernandez, C. Ternicier and P. Avalos (2010). "Pandemic (H1N1) 2009 in breeding turkeys, Valparaiso, Chile." *Emerg Infect Dis* 16(4): 709-711.
- Matrosovich, M., N. Zhou, Y. Kawaoka and R. Webster (1999). "The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties." *J Virol* 73(2): 1146-1155.
- Max, V., J. Herrera, R. Moreira and H. Rojas (2007). "Avian influenza in Chile: a successful experience." *Avian Dis* 51(1 Suppl): 363-365.
- Munster, V. J., C. Baas, P. Lexmond, J. Waldenstrom, A. Wallensten, T. Fransson, G. F. Rimmelzwaan, W. E. Beyer, M. Schutten, B. Olsen, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2007). "Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds." *PLoS Pathog* 3(5): e61.
- Munster, V. J., J. Veen, B. Olsen, R. Vogel, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2006). "Towards improved influenza A virus surveillance in migrating birds." *Vaccine* 24(44-46): 6729-6733.
- Munster, V. J., A. Wallensten, C. Baas, G. F. Rimmelzwaan, M. Schutten, B. Olsen, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2005). "Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe." *Emerg Infect Dis* 11(10): 1545-1551.
- Naeem, K., A. Ullah, R. J. Manvell and D. J. Alexander (1999). "Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan." *Vet Rec* 145(19): 560.
- Nardelli, L., A. Rinaldi, H. G. Pereira and G. Mandelli (1970). "[Influenza virus infections in Japanese quails]." *Arch Exp Veterinarmed* 24: 231-249.
- Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou and S. Barman (2009). "Influenza virus morphogenesis and budding." *Virus Res* 143(2): 147-161.
- Nayak, D. P., E. K. Hui and S. Barman (2004). "Assembly and budding of influenza virus." *Virus Res* 106(2): 147-165.
- Normile, D. (2005). "Avian influenza. Are wild birds to blame?" *Science* 310(5747): 426-428.
- Normile, D. (2006). "Avian influenza. Evidence points to migratory birds in H5N1 spread." *Science* 311(5765): 1225.
- OIE. (2009). "World Organisation for Animal Health. Weekly disease information. Follow-up reports." cited 2009 Dec 3.

- Olsen, B., V. J. Munster, A. Wallensten, J. Waldenstrom, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2006). "Global patterns of influenza A virus in wild birds." *Science* 312(5772): 384-388.
- Olsen, C. W., N. Dybdahl-Sissoko and V. S. Hinshaw (1996). "The influence of calcium and reactive oxygen species on influenza virus-induced apoptosis." *Cell Death Differ* 3(2): 191-197.
- Park, Y. W. and M. G. Katze (1995). "Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation." *J Biol Chem* 270(47): 28433-28439.
- Pereda, A. J., M. Uhart, A. A. Perez, M. E. Zaccagnini, L. La Sala, J. Decarre, A. Goijman, L. Solari, R. Suarez, M. I. Craig, A. Vagnozzi, A. Rimondi, G. Konig, M. V. Terrera, A. Kaloghlian, H. Song, E. M. Sorrell and D. R. Perez (2008). "Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America." *Virology* 378(2): 363-370.
- Perroncito, E. (1878). "Epizootia tifoide nei gallinacci." *Ann Acad Agric*(21): 87.
- Portela, A. and P. Digard (2002). "The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication." *J Gen Virol* 83(Pt 4): 723-734.
- Rappole, J. H. and Z. Hubalek (2006). "Birds and influenza H5N1 virus movement to and within North America." *Emerg Infect Dis* 12(10): 1486-1492.
- Reed, K. D., J. K. Meece, J. S. Henkel and S. K. Shukla (2003). "Birds, migration and emerging zoonoses: west Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens." *Clin Med Res* 1(1): 5-12.
- Richardson, J. C. and R. K. Akkina (1991). "NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells." *Arch Virol* 116(1-4): 69-80.
- Rimondi, A., K. Xu, M. I. Craig, H. Shao, H. Ferreyra, M. V. Rago, M. Romano, M. Uhart, T. Sutton, A. Ferrero, D. R. Perez and A. Perea (2011). "Phylogenetic analysis of H6 Influenza viruses isolated from Rosy-billed pochards (*Netta Peponaca*) in Argentina reveals the presence of different HA gene clusters." *Journal of Virology* 85(24): 13354-13362.
- Roberts, P. C., R. A. Lamb and R. W. Compans (1998). "The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation." *Virology* 240(1): 127-137.
- Rohm, C., N. Zhou, J. Suss, J. Mackenzie and R. G. Webster (1996). "Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes." *Virology* 217(2): 508-516.
- Rojas, H., R. Moreira, P. Avalos, I. Capua and S. Marangon (2002). "Avian influenza in poultry in Chile." *Vet Rec* 151(6): 188.
- Ruigrok, R. W. and F. Baudin (1995). "Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles." *J Gen Virol* 76 (Pt 4): 1009-1014.
- Schafer, W. (1955). "Sero-immunologic studies on incomplete forms of the virus of classical fowl plague (German)." *Arch Exp Veterinarmed*(9): 218-230.

- Schultz-Cherry, S., N. Dybdahl-Sissoko, G. Neumann, Y. Kawaoka and V. S. Hinshaw (2001). "Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells." *J Virol* 75(17): 7875-7881.
- Schultz-Cherry, S. and V. S. Hinshaw (1996). "Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta." *J Virol* 70(12): 8624-8629.
- Senne, D. A., J. C. Pedersen, D. L. Suarez and B. Panigrahy (2006). "Rapid diagnosis of avian influenza (AI) and assessment of pathogenicity of avian H5 and H7 subtypes by molecular methods." *Dev Biol (Basel)* 126: 171-177; discussion 326-177.
- Si, Y., A. K. Skidmore, T. Wang, W. F. de Boer, P. Debba, A. G. Toxopeus, L. Li and H. H. Prins (2009). "Spatio-temporal dynamics of global H5N1 outbreaks match bird migration patterns." *Geospat Health* 4(1): 65-78.
- Sidorenko, Y. and U. Reichl (2004). "Structured model of influenza virus replication in MDCK cells." *Biotechnol Bioeng* 88(1): 1-14.
- Sims, L. D., T. M. Ellis, K. K. Liu, K. Dyrting, H. Wong, M. Peiris, Y. Guan and K. F. Shortridge (2003). "Avian influenza in Hong Kong 1997-2002." *Avian Dis* 47(3 Suppl): 832-838.
- Sinclair, M., G. K. Bruckner and J. J. Kotze (2006). "Avian influenza in ostriches: epidemiological investigation in the Western Cape Province of South Africa." *Vet Ital* 42(2): 69-76.
- Skehel, J. J., K. Cross, D. Steinhauer and D. C. Wiley (2001). "Influenza fusion peptides." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 4): 623-626.
- Spackman, E., K. G. McCracken, K. Winker and D. E. Swayne (2006). "H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys." *J Virol* 80(15): 7760-7764.
- Spackman, E., K. G. McCracken, K. Winker and D. E. Swayne (2007). "An avian influenza virus from waterfowl in South America contains genes from North American avian and equine lineages." *Avian Dis* 51(1 Suppl): 273-274.
- Spackman, E., D. A. Senne, S. Davison and D. L. Suarez (2003). "Sequence analysis of recent H7 avian influenza viruses associated with three different outbreaks in commercial poultry in the United States." *J Virol* 77(24): 13399-13402.
- Spackman, E., D. E. Stallknecht, R. D. Slemons, K. Winker, D. L. Suarez, M. Scott and D. E. Swayne (2005). "Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation." *Virus Res* 114(1-2): 89-100.
- Stallknecht, D. E., M. T. Kearney, S. M. Shane and P. J. Zwank (1990). "Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water." *Avian Dis* 34(2): 412-418.
- Sturm-Ramirez, K. M., T. Ellis, B. Bousfield, L. Bissett, K. Dyrting, J. E. Rehg, L. Poon, Y. Guan, M. Peiris and R. G. Webster (2004). "Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks." *J Virol* 78(9): 4892-4901.
- Sturm-Ramirez, K. M., D. J. Hulse-Post, E. A. Govorkova, J. Humberd, P. Seiler, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. Chaisingh, H. T. Long, T. S. Naipospos, H. Chen, T. M. Ellis, Y. Guan, J. S. Peiris and R. G. Webster (2005). "Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia?" *J Virol* 79(17): 11269-11279.

- Suarez, D. L., M. Garcia, J. Latimer, D. Senne and M. Perdue (1999). "Phylogenetic analysis of H7 avian influenza viruses isolated from the live bird markets of the Northeast United States." *J Virol* 73(5): 3567-3573.
- Suarez, D. L., D. A. Senne, J. Banks, I. H. Brown, S. C. Essen, C. W. Lee, R. J. Manvell, C. Mathieu-Benson, V. Moreno, J. C. Pedersen, B. Panigrahy, H. Rojas, E. Spackman and D. J. Alexander (2004). "Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile." *Emerg Infect Dis* 10(4): 693-699.
- Suarez, D. L., E. Spackman and D. A. Senne (2003). "Update on molecular epidemiology of H1, H5, and H7 influenza virus infections in poultry in North America." *Avian Dis* 47(3 Suppl): 888-897.
- Subbarao, K., A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda and N. Cox (1998). "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness." *Science* 279(5349): 393-396.
- Suss, J., J. Schafer, H. Sinnecker and R. G. Webster (1994). "Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany." *Arch Virol* 135(1-2): 101-114.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." *Mol Biol Evol* 24(8): 1596-1599.
- Tiensen, T., P. Chaitaweesub, T. Songserm, A. Chaisingh, W. Hoonsuwan, C. Buranathai, T. Parakamawongsa, S. Premashthira, A. Amonsin, M. Gilbert, M. Nielsen and A. Stegeman (2005). "Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004." *Emerg Infect Dis* 11(11): 1664-1672.
- Tong, S., Y. Li, P. Rivallier, C. Conrardy, D. A. Castillo, L. M. Chen, S. Recuenco, J. A. Ellison, C. T. Davis, I. A. York, A. S. Turmelle, D. Moran, S. Rogers, M. Shi, Y. Tao, M. R. Weil, K. Tang, L. A. Rowe, S. Sammons, X. Xu, M. Frace, K. A. Lindblade, N. J. Cox, L. J. Anderson, C. E. Rupprecht and R. O. Donis (2012). "A distinct lineage of influenza A virus from bats." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(11): 4269-4274.
- Tweed, S. A., D. M. Skowronski, S. T. David, A. Larder, M. Petric, W. Lees, Y. Li, J. Katz, M. Krajdien, R. Tellier, C. Halpert, M. Hirst, C. Astell, D. Lawrence and A. Mak (2004). "Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia." *Emerg Infect Dis* 10(12): 2196-2199.
- Villarreal-Chavez, C. and E. Rivera-Cruz (2003). "An update on avian influenza in Mexico." *Avian Dis* 47(3 Suppl): 1002-1005.
- Wagner, R., M. Matrosovich and H. D. Klenk (2002). "Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections." *Rev Med Virol* 12(3): 159-166.
- Wallensten, A., V. J. Munster, J. Elmer, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier and B. Olsen (2005). "Multiple gene segment reassortment between Eurasian and American lineages of influenza A virus (H6N2) in Guillemot (*Uria aalge*)." *Arch Virol* 150(8): 1685-1692.
- Wallensten, A., V. J. Munster, N. Latorre-Margalef, M. Brytting, J. Elmer, R. A. Fouchier, T. Fransson, P. D. Haemig, M. Karlsson, A. Lundkvist, A. D. Osterhaus, M. Stervander, J. Waldenstrom and O. Bjorn (2007). "Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe." *Emerg Infect Dis* 13(3): 404-411.

- Weber, T. P. and N. I. Stilianakis (2007). "Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds." *Emerg Infect Dis* 13(8): 1139-1143.
- Webster, R. G. (2002). "The importance of animal influenza for human disease." *Vaccine* 20 Suppl 2: S16-20.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers and Y. Kawaoka (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev* 56(1): 152-179.
- Webster, R. G., Y. Guan, M. Peiris, D. Walker, S. Krauss, N. N. Zhou, E. A. Govorkova, T. M. Ellis, K. C. Dyrting, T. Sit, D. R. Perez and K. F. Shortridge (2002). "Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China." *J Virol* 76(1): 118-126.
- WHO (2008). "Weekly epidemiological record." (83): 357-364.
- WHO. (2009). "Pandemic (H1N1)." <http://www.who.int/csr/diseases/swineflu/en/index.html>. cited 2009 Sept 2.
- WHO. Memorandum (1980) "A revised system of nomenclature for influenza viruses." *Bull WHO* 58, 585-591.
- Widjaja, L., S. L. Krauss, R. J. Webby, T. Xie and R. G. Webster (2004). "Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses." *J Virol* 78(16): 8771-8779.
- Xu, X., Subbarao, N. J. Cox and Y. Guo (1999). "Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong." *Virology* 261(1): 15-19.
- Yamnikova, S. S., A. S. Gambaryan, A. B. Tuzikov, N. V. Bovin, M. N. Matrosovich, I. T. Fedyakina, A. A. Grinev, V. M. Blinov, D. K. Lvov, D. L. Suarez and D. E. Swayne (2003). "Differences between HA receptor-binding sites of avian influenza viruses isolated from Laridae and Anatidae." *Avian Dis* 47(3 Suppl): 1164-1168.
- Zhang, G., D. Shoham, D. Gilichinsky, S. Davydov, J. D. Castello and S. O. Rogers (2006). "Evidence of influenza A virus RNA in siberian lake ice." *J Virol* 80(24): 12229-12235.
- Zhou, N. N., K. F. Shortridge, E. C. Claas, S. L. Krauss and R. G. Webster (1999). "Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong." *J Virol* 73(4): 3366-3374.