

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN INMUNOHEMATOLOGÍA DIAGNÓSTICA

Análisis Genético del Virus de Influenza A/H1N1 Pandémico Resistente a Oseltamivir, para Detectar la Mutación H275Y en el Gen de la Neuraminidasa Asociada con la Resistencia

Trabajo Individual Escrito

Que para obtener el Diploma de

Especialidad en Inmunohematología Diagnóstica

Presenta

1942

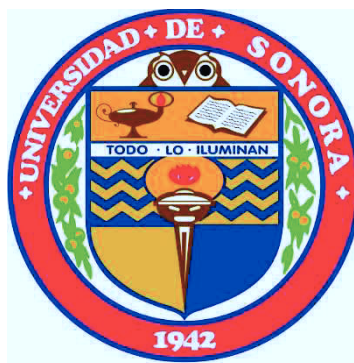
Lesly Romero Beltrán

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado Calificador designado para revisar el Trabajo Individual escrito de la **Q.B.C. Lesly Romero Beltrán**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el diploma de Especialización en Inmunohematología Diagnóstica.

Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Director de Tesis

Dr. Jesús Hernández López
Secretario

Dra. Maricela Montalvo Corral
Vocal

Dra. Adriana Garibay Escobar
Suplente

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco especialmente a CONACYT por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto, agradezco a la Universidad de Sonora, al programa de Especialización en Inmunohematología Diagnóstica, en especial al coordinador del programa, Dr. Eduardo Ruiz Bustos, y a la asistente administrativo del programa Denia Abril Montes. Agradezco de igual manera a mi asesora Dra. Olivia Valenzuela Antelo por el apoyo brindado y la dirección para la elaboración de esta tesis. Al Dr. Jesús Hernández por permitirme trabajar en su laboratorio, asesorarme y brindarme los recursos para la realización de esta tesis. A la Dra. Maricela Montalvo Corral por su asesoramiento, al igual que a la Dra. Adriana Garibay Escobar por el asesoramiento para la realización de este trabajo. Un agradecimiento muy especial a la Dra. Guadalupe Ayora Talavera por ser codirectora de esta tesis, y por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto, agradezco también el proporcionar las muestras que se trabajaron y por el asesoramiento recibido. Agradezco el apoyo técnico recibido por la Q.B.C. Mónica Reséndiz Sandoval, que fue una parte fundamental del trabajo experimental realizado y por su asesoramiento en cuanto a técnicas de laboratorio, gracias por enseñarme lo que hoy se de biología molecular. Agradezco a todos los profesores que me impartieron clases durante mi posgrado, ya que gracias a ellos obtuve las herramientas para la realización de este trabajo.

Dedico este trabajo a mi familia, en especial a mis padres que me han apoyado siempre en todo, a mi papá que siempre me escucha y se interesa en lo que hago aunque a veces no me entienda, gracias por ser el mejor papá que alguien pueda llegar a tener, a mi mamá que ha estado a mi lado y me ha brindado su cariño, a mis hermanos, Martin y Gabriel que aun sin darse cuenta han sido una parte muy importante en la realización de este trabajo, ya que son

en parte la razón para seguir en esto, a mis hermanitos Karla, Karina y Tony, por su cariño. Este trabajo está dedicado a quienes en este momento son parte de mi familia, a mis amigos, Jan, por compartir conmigo toda esta etapa, Ansix y Lily porque de verdad me faltarían palabras que decir de ustedes, pero sé que me entienden y saben que las quiero mucho, gracias, a mis amigos, Lalo, Any, Blanca, Mickey, y Caro, este trabajo también lo dedico con muchísimo cariño a mi amiga Bere, por enseñarme tanto en tan poco tiempo, porque va a ser alguien que siempre voy a llevar conmigo, a la familia López Martínez por haberme tratado siempre como una más de la familia, porque siempre los he sentido mi familia, gracias, también dedico este trabajo a mis tíos, tías y primos por estar siempre conmigo.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
OBJETIVOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Pandemia de Influenza en 2009.....	4
Virus Influenza.....	7
Proteínas Virales.....	9
Virus Influenza A/H1N1 Humano de 2009.....	9
Tratamiento y Prevención.....	13
Inhibidores de la Neuraminidasa.....	14
Mutaciones Asociadas con la Resistencia a Oseltamivir.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Obtención de las Muestras.....	18
Inactivación de las Muestras.....	18
Extracción de RNA.....	19
Preparación de Mezclas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	19
Visualización de los Productos de la PCR.....	19
Purificación de DNA.....	20
Análisis Genéticos.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	34
REFERENCIAS.....	35

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Descripción de la función de las proteínas de los virus influenza A.....	10
II	Secuencias de nucleótidos del gen de NA, obtenidas de cada muestra, amplificando con los iniciadores NA-726 Fw y NA-1452 Rv.....	24
III	Secuencia de aminoácidos de la proteína neuraminidasa.....	27
IV	Mutaciones detectadas en el gen de la NA de las muestras analizadas.....	29
V	Listado de mutaciones, en donde se presentan las mutaciones que ya se han reportado y que se asocian a la resistencia y las que se detectaron en este estudio.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución de casos de influenza A/H1N1 en 2009.....	6
2	Representación esquemática del virus influenza.....	8
3	Esquema de la recombinación viral para la generación del virus influenza A/H1N1 humano de 2009.....	12
4	Estructura del ácido siálico y los inhibidores de la neuraminidasa, zanamivir y oseltamivir.....	15
5	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con el producto de PCR utilizando los iniciadores NA-0 Fw y NA-1452 Rv.....	22
6	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con el producto de PCR anidado utilizando los iniciadores NA-752 Fw y NA-1452 Rv.....	23
7	Alineación de aminoácidos de un virus resistente y un virus susceptible con las muestras analizadas.....	28
8	Sitio activo de la neuraminidasa.....	32

OBJETIVOS

General

Analizar genéticamente virus A/H1N1 pandémico resistente al oseltamivir para detectar la mutación H275Y en el gen de la neuraminidasa asociada con la resistencia.

Particulares

1. Amplificar por PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) un segmento del gen de la neuraminidasa de los virus resistentes a oseltamivir aislados en Yucatán.
2. Analizar la secuencia genética en busca de la mutación H275Y.

RESUMEN

En abril de 2009 se hizo público a nivel nacional la presencia de un virus de influenza en humanos nunca antes descrito denominado virus de influenza (A/H1N1). Dada la tasa de transmisión del virus y su rápida dispersión a todos los continentes del mundo, la Organización Mundial de la Salud declaró el estatus de pandemia. El Estado de Yucatán, no fue la excepción, al reportar casos de infección humana con el virus pandémico; ocupó el segundo lugar en el país en casos reportados. Se sabe que el virus de la influenza ha desarrollado resistencia a algunos antivirales, entre ellos el oseltamivir. Esta resistencia se ha asociado con la mutación H275Y en la proteína neuraminidasa. Es importante el monitoreo del surgimiento de virus resistentes, ya que esto permite generar terapias alternas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio es analizar genéticamente el virus A/H1N1 resistente a oseltamivir para detectar esta mutación. Para la realización de este trabajo se utilizaron virus obtenidos de aislados clínicos resistentes a oseltamivir. Se amplificó un segmento de aproximadamente 670 pb del gen de la neuraminidasa de 5 muestras por RT-PCR. Posteriormente, se secuenciaron para su análisis y la búsqueda de la mutación. Las secuencias obtenidas se compararon con la del virus de la Influenza A virus (A/Wisconsin/629-D01667/2009(H1N1)) que no presenta la mutación y con el de la Influenza A virus (A/Mexico/InDRE797/2010(H1N1)) que la presenta. Al alinearlas y compararlas se observó que ninguna de las secuencias obtenidas de los virus analizados presentó la mutación H275Y. Sin embargo, se encontraron otras mutaciones cercanas al sitio activo de la enzima, los cuales podrían explicar la disminución de su susceptibilidad a oseltamivir.

INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad causada por un virus que se presenta causando epidemias anuales y pandemias ocasionales, con intervalos de tiempo irregulares (Martin y col., 2009). A mediados de Febrero de 2009, surge en el municipio de La Gloria en el estado de Veracruz, México, una enfermedad respiratoria tipo influenza. Posteriormente, a mediados de abril, se empiezan a investigar por parte de la Secretaria de Salud un gran número de casos de neumonía y de enfermedad tipo influenza, esto se reporta a la Organización Panamericana de Salud (PAHO), que pertenece a la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Newmann y col., 2009), y en Estados Unidos el Centro de Control de Enfermedades (CDC) identifica al virus influenza A/H1N1 de origen porcino y en este mismo mes se detecta en Canadá. La diseminación es tan rápida, debido a la transmisibilidad de persona a persona, que el día 27 de Abril, la WHO declara una alerta pandémica fase 4 para el virus Influenza A/H1N1 (Dawood y col., 2009). A un mes de haberse reportado el primer caso en México, 41 países reportaban ya 11,034 casos presentándose así la primera pandemia del Siglo XXI, causada por un virus influenza.

El virus influenza A/H1N1 responsable de la pandemia de 2009, es un virus con una conformación genética diferente a los que se encontraban en circulación, esto se debe a que este virus se generó por la combinación de cuatro cepas de virus influenza diferentes: la clásica porcina, la aviar norteamericana, la humana H3N2 y la porcina euroasiática (Garten y col., 2009; Newmann y col., 2009), esto hace que el virus cumpla con una de las tres características de un virus para generar una pandemia, que es el hecho de ser una cepa nueva, contra la cual la población no tiene inmunidad, que pueda replicarse en humanos y la más importante, la capacidad de transmitirse de persona a persona. El virus

A/H1N1 al igual que el de 1918, 1957 y 1968 al cumplir con estas características se convirtió en un virus pandémico (Vega y Reyes, 2007).

Dentro de las características de un virus influenza A tenemos que es un virus perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, con RNA de sentido negativo, tiene un genoma de ocho segmentos, que codifican para doce proteínas; entre estas tenemos a las responsables de la antigenicidad de este virus que son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) (Jofré, 2007). La HA es la encargada de la unión a los receptores celulares y la NA juega un papel importante en la liberación de los viriones de la célula infectada, y esto lo hace rompiendo las uniones entre el ácido siálico y la HA (Newmann y col., 2009).

Actualmente se cuenta con dos tipos de tratamientos antivirales para los casos de enfermedad por virus influenza, los amantanos o inhibidores de la proteína M2 y los inhibidores de la neuraminidasa (INAs) (Moscona, 2005a). Los amantanos bloquean el canal iónico, que permite la liberación del material genético en la célula, con lo que evitan que se inicie la replicación (Hayden, 2009), el uso de estos antivirales se ha visto limitado por la aparición de cepas de virus resistentes, entre estos el A/H1N1 responsable de la pandemia de 2009 (Newmann y col., 2009), por lo que para el tratamiento de este virus solo se utilizan los inhibidores de la neuraminidasa: zanamivir y oseltamivir (Democratis y col., 2006). Estos actúan uniéndose al sitio activo de la NA y de esta manera evitan que esta actúe liberando a los viriones y estos no puedan colonizar el epitelio respiratorio (Democratis y col., 2006). Actualmente, se han reportado un total de 566 casos de virus resistente al oseltamivir (WHO, 2011) la resistencia al carboxilato de oseltamivir, está asociado principalmente a una mutación en la posición 275 en el sitio activo de la NA de histidina a tirosina (Hayden, 2009); sin embargo, ahora se sabe que esta no es la única mutación asociada a la resistencia. El presente trabajo tuvo como objetivo principal la

búsqueda de la mutación H275Y en cepas de virus A/H1N1 resistentes a oseltamivir aislados en Yucatán. Este trabajo formó parte de un proyecto mayor financiado por CONACYT y los resultados forman parte de un programa de vigilancia epidemiológica para el monitoreo de virus resistentes al oseltamivir.

ANTECEDENTES

Pandemia de Influenza en 2009

La influenza es una enfermedad causada por un virus, este puede ser de tres tipos, A, B y C. El B y C son exclusivamente de humanos, mientras que el virus A puede infectar a humanos pero también a otros mamíferos incluso a algunas aves (Martin y col., 2009). El virus A es el que presenta una mayor tasa de mortalidad y es el que se relaciona con las pandemias (Newmann y col., 2009).

A través de la historia se han presentado brotes epidémicos anuales de influenza y algunas pandemias ocasionales (Martin y col., 2009). Entre las pandemias del siglo XX tenemos que en 1918 surge la pandemia de influenza más devastadora que infectó cerca del 25% de la población mundial y causó la muerte de 50 millones de personas, este virus de origen aviar era del subtipo H1N1 (Belshe, 2005); posteriormente, en 1957 surge la pandemia asiática, el virus responsable de alrededor de tres millones de muertes fue un virus del subtipo H2N2; finalmente, el responsable de la conocida como gripe de Hong Kong fue un virus H3N2, esto ocurrió entre 1968 y 1970. Debido a que las pandemias anteriores se habían presentado con intervalos de 30 a 50 años, se esperaba que para principios del siglo XXI se presentara una nueva pandemia (Martin y col., 2009).

En Febrero de 2009, en el municipio de La Gloria, Veracruz en México se presenta el primer caso registrado de un nuevo brote de una enfermedad tipo influenza, para principios del mes de Abril ya se tenían en el país un gran número de casos, en los que en su mayoría se presentaba fiebre, tos, dolor de garganta, en algunos diarrea y/o vómito; en los casos más severos se presentaba dificultad respiratoria, neumonía e incluso la muerte. El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos reporta el 15 de Abril

en San Diego, California un caso en el que se identifica un virus similar al reportado por la WHO. El 21 de Abril la CDC informa de una nueva cepa de virus influenza A/H1N1, a los dos días que se identifica esta nueva cepa, el 23 de abril la Agencia de Salud Pública de Canadá identifica un virus influenza de origen porcino A/H1N1 en muestras recibidas de México, debido a esto, la WHO el 24 de abril informa un nuevo brote de influenza, es solo 5 días después el 29 de abril que entonces se declara una alerta pandémica de fase 5 (Dawood y col., 2009). La proporción de esta pandemia fue tal que para el día 21 de mayo, 41 países ya habían reportaron 11,034 casos y 85 muertes. En junio del mismo año, se declara la alerta pandémica de fase 6 y esta se mantiene durante catorce meses. En agosto de 2010, la WHO declara el inicio de la fase postpandémica con un recuento de más de 18,000 muertos a nivel mundial (Agencia noticiosa CNN, 2010).

La situación en México muestra que para el 25 de Junio de 2009 se habían reportado 9,028 casos en todo el país y un total de 119 defunciones; los estados del centro y sur de la república fueron los que presentaron un mayor número de casos, siendo el Distrito Federal el más afectado con 2,085 casos, seguido por Yucatán y Chiapas que presentaron 913 y 657 casos respectivamente. Los síntomas más frecuentes fueron: fiebre, tos, y dificultad respiratoria (Secretaria de Salud, 2009). Se presentaron tres olas epidémicas en el país a lo largo del 2009, la primera fue la ola de primavera, que se presentó entre el 1 de Abril y el 20 de Mayo, la ola de verano se presentó del 21 de Mayo al 1 de Agosto, y la ola de otoño del 2 de Agosto al 31 de Diciembre. La distribución de casos por estado correspondientes a cada una de estas, se muestra en la figura 1.

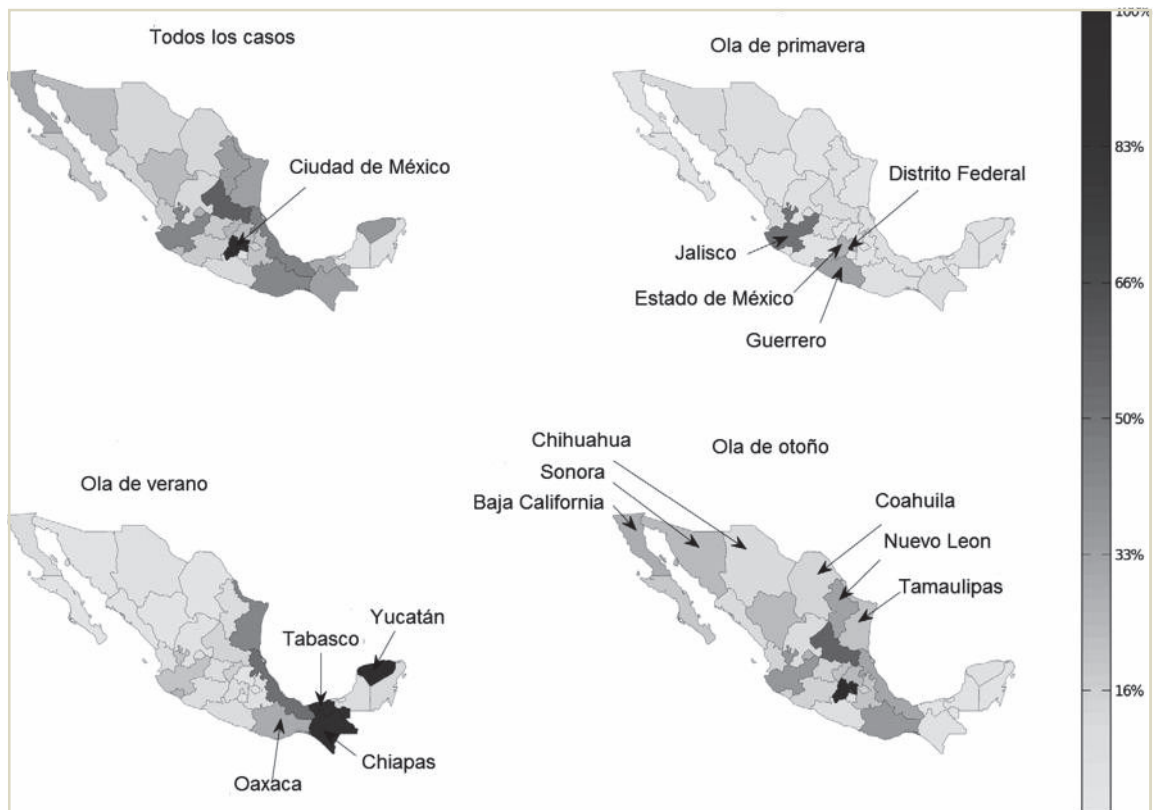


Figura 1. Distribución de casos de influenza A/H1N1 en 2009. Presentados en cada estado de la República correspondientes a cada una de las olas presentadas, y al total de casos: La intensidad del color representa la cantidad de casos presentados.

Fuente: Chowell y col., 2011

Virus Influenza

Es un virus RNA, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, tiene un genoma de 8 segmentos, que codifica para 12 proteínas (Bhoumik y Hughes, 2010), algunos de los segmentos codifican para dos proteínas, es de polaridad negativa, tiene envoltura, que es una bicapa lipídica tomada de la membrana celular, en el exterior de la envoltura se encuentran las proteínas HA y NA y en el interior una capa formada por la proteína matriz, y más internamente encontramos la nucleocápside helicoidal formada por siete segmentos de RNA en el caso de los virus C y ocho segmentos en los virus A y B; este virus es pleomórfico (Vega y Reyes, 2007), tiene un diámetro que va de 50 a 120 nm, y se divide en 3 tipos serológicamente diferentes, A, B y C (Martin y col., 2009) (figura 2).

El virus influenza tipo B ocasiona enfermedades en el humano; el tipo C se ha encontrado en humanos y en cerdos; pero el tipo A, que es el responsable de todas las pandemias de las que se tenga registro, se ha logrado aislar en cerdos, caballos, perros, aves acuáticas, aves de corral, humanos y otros mamíferos (Talledo y Zumaeta, 2009). Esto le permite a este virus recombinarse con facilidad y generar nuevas cepas, el cerdo es considerado el principal huésped intermediario para que se lleve a cabo la diseminación del virus influenza interespecies, esto es debido a que posee receptores tanto para los virus aviares como para los de mamíferos (Vaqué y col., 2009).

Los virus influenza A, son clasificados en subtipos dependiendo de las proteínas HA y NA. Se han descrito 16 tipos de HA y 9 tipos de NA (Salomon y Webster, 2009). En las aves acuáticas por coexistir los 16 tipos de HA y los 9 de NA pueden presentarse hasta 144 combinaciones. En humanos actualmente sólo se encuentran en circulación dos diferentes subtipos, H3N2, y H1N1 (Talledo y Zumaeta, 2009).

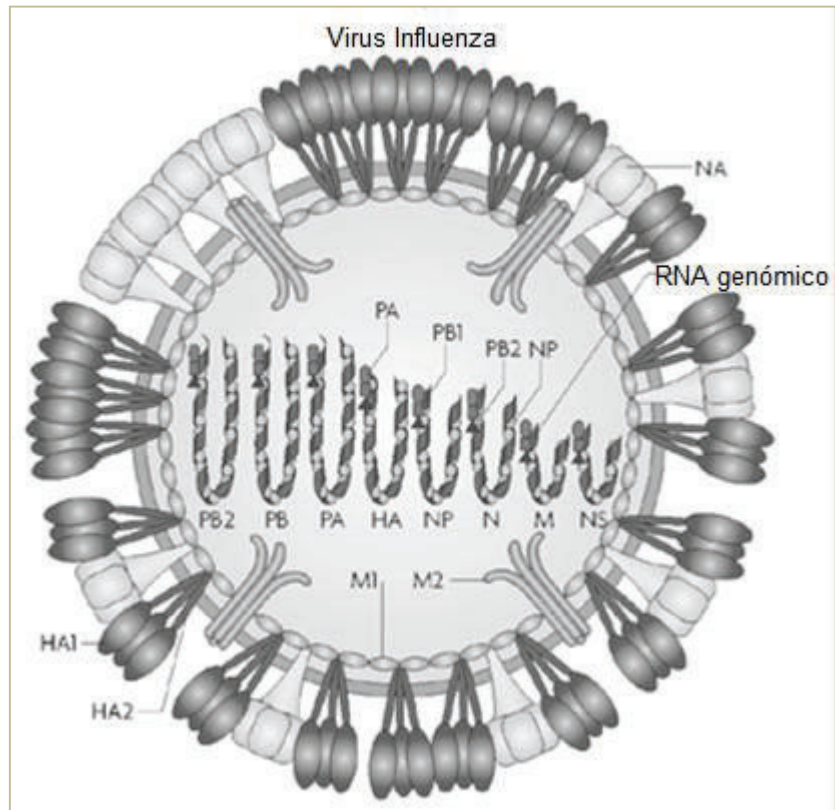


Figura 2. Representación esquemática del virus influenza. En donde se pueden observar las proteínas de la superficie viral, así como los segmentos del genoma viral.

Fuente: Karlsson y col., 2008

Además de los antígenos de superficie, el genoma viral codifica para otras diez proteínas, que son polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa ácida (PA), proteína de la nucleocápside (NP), proteína de la matriz 1 (M1), proteína de la matriz 2 (M2); tanto M1 como M2 son codificadas por el mismo segmento de RNA pero con diferente marco de lectura, lo mismo sucede con la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína no estructural 2 (NS2) (Rovid, 2009). La proteína PB1-F2, es una proteína proapoptótica que se presenta en algunas cepas de los virus influenza, se ha descubierto recientemente la proteína N40, es una proteína no estructural de función desconocida (Medina y García, 2011).

Proteínas Virales

La tabla I, muestra las principales funciones de cada una de las proteínas virales, estas son características generales de todos los virus influenza A.

Virus Influenza A/H1N1 Humano de 2009

El virus A/H1N1 humano de 2009 se caracterizó por poseer un rearrreglo genómico procedente de 4 líneas filogenéticas (Fraser y col., 2009) nunca antes descrito en animales o humanos. El análisis genético de este virus y su comparación con secuencias de virus de animales y humano ya existentes, permitió identificar claramente que este virus surgió de una serie de eventos y recombinaciones entre segmentos de RNA provenientes de diferentes fuentes. La figura 3, es un esquema que muestra el origen del virus A/H1N1.

El nuevo virus no presenta ninguna de las características moleculares conocidas que indiquen un aumento en la patogenicidad, así que se desconoce porque se produjo el salto entre especies y la facilidad de transmisión entre humanos, también se ha visto que vacunas para la influenza estacional circulantes antes de la aparición del nuevo virus tienen efectividad contra el

Tabla I. Descripción de la función de las proteínas de los virus influenza A.

Segmento	Función de la(s) proteína(s)	Abreviatura
1	Participa en la iniciación de la transcripción, se une al Cap-I de los RNAPre-m, es señalado como responsable del clivaje endonucleolítico de los RNA pre-m celulares.	PB2
2	Forma parte del complejo de la RNA polimerasa, y es la encargada de la elongación del RNAm viral sintetizado, así como también la elongación del templado de RNA y de la síntesis de RNA viral.	PB1
3	Se asocia con la replicación del RNAv y se sabe que puede producir proteólisis tanto de proteínas del huésped como virales.	PA
4	Es una glicoproteína que contiene de 2 a 3 sitios de glicosilación, forma homotrimeros durante su maduración permite la adsorción viral a receptores celulares que contienen ácido siálico; de esta manera es introducido a la célula en una vesícula por endocitosis, la posterior acidificación de esta vesícula conlleva a un cambio en la conformación de la HA e induce la fusión del manto viral con la membrana endocítica y la liberación del contenido de la membrana en el citoplasma. La HA tiene afinidad por ciertos receptores dependiendo de su origen, es decir, la HA de virus aviarios se unen al ácido siálico en la conformación SA α 2,3Gal, mientras que los virus de influenza humanos se unen preferencialmente al ácido siálico ligado a galactosa en uniones SA α 2,6Gal. La tasa de mutación de esta proteína es muy alta de alrededor de una sustitución de bases por cada generación viral	HA
5	Se asocia al RNA viral y a las polimerasas formando la nucleocápside helicoidal, además junto a la proteína M1 forma el antígeno profundo que permita clasificar a los virus influenza en tipo A, B o C	NP
6	Es una sialidasa que cataliza las uniones glicosídicas con el ácido siálico, acción que interviene en la liberación de viriones fuera de las células infectadas y previene la agregación de los mismos, esto es mediado por el sitio catalítico que se encuentra en la cabeza de la enzima. La NA se encuentra formando un homotetrámero, y tiene regiones altamente conservadas en su sitio activo con respecto a otros virus A y B, no se encuentran en todo el virión, sino concentrados en parches de la envoltura, rompe los enlaces de ácido N-acetil-neuramínico del mucus para que el virus pueda establecerse en el aparato respiratorio superior, y se encuentra en una cantidad 4 veces menor a la HA, y al igual que esta la NA se asocia con la patogenicidad viral	NA

Tabla I. Descripción de la función de las proteínas de los virus influenza A.
(Continuación)

Segmento	Función de la(s) proteína(s)	Abreviatura
7	La proteína M1 forma la matriz, es la proteína más abundante en el virión, la proteína M2 actúa como un canal iónico que mantiene estable el pH en el endosoma	M1, M2
8	Estas dos proteínas no se detectan en el virión pero si se presentan en altas concentraciones en las células infectadas, la NS1 es un inmunomodulador, inhibe el interferón de tipo I, la NS2 junto con la M1 está implicada en la exportación de las ribonucleoproteínas genómicas, también se le conoce como NEP	NS1, NS2

(Luchsinger, 2009; Webster y col., 1992; Gulsah y col., 2008; Salomón y col., 2009; Fodor y col., 2002; Akarsu y col., 2003; Ma y col., 2001; Plotkin y col., 2002; Kawaoka, 2006; Newmann y col., 2009; Talledo y Zumaeta, 2009; Vega y Reyes, 2007; Li y col., 2010; Banks y col., 2001; Garten y col., 2009).

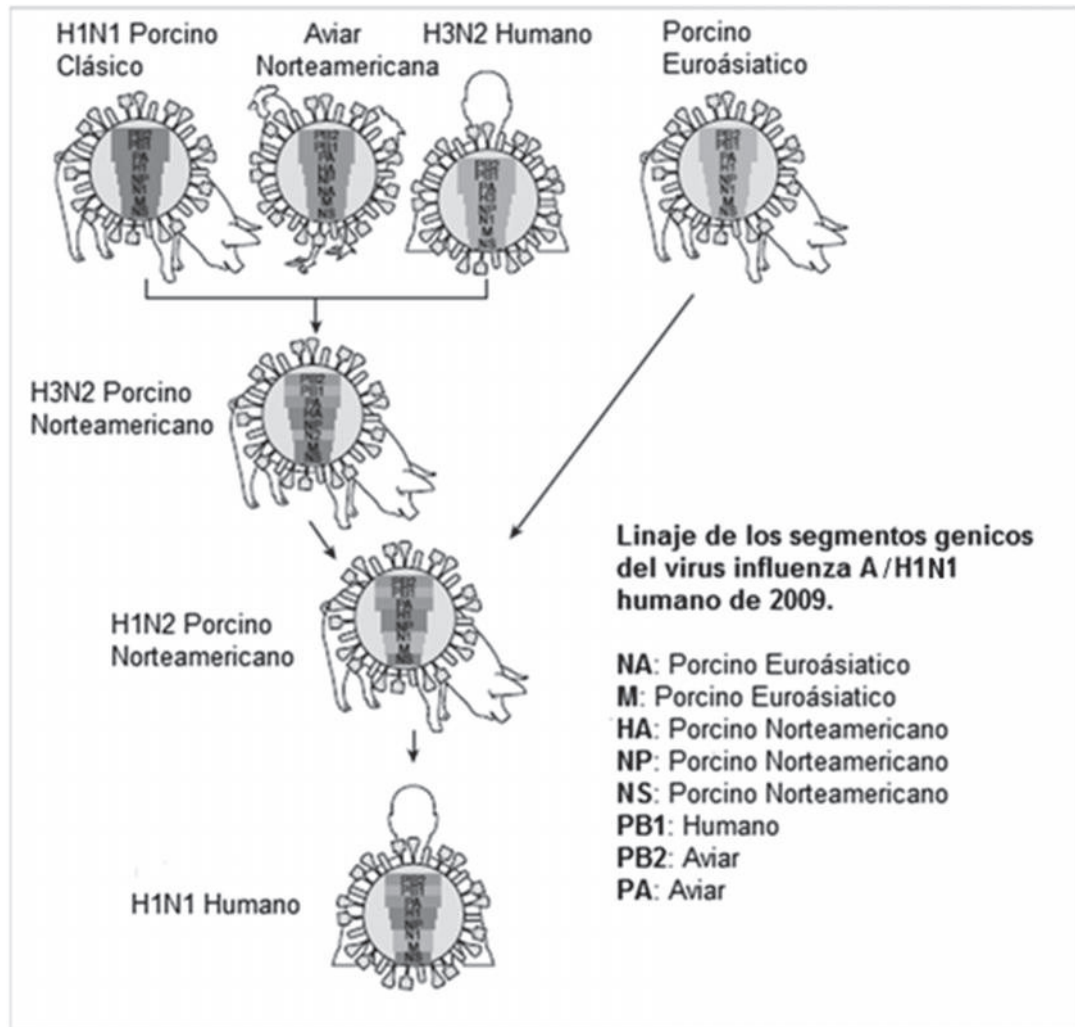


Figura 3. Esquema de la recombinación viral para la generación del virus influenza A/H1N1 humano de 2009.

Fuente: Adaptado de Neumann y col., 2009.

mismo, esto se debe a que se produce una inmunidad cruzada ya que hay dominios en la HA que se encuentran muy conservados (Wrammert y col., 2011).

El surgimiento de este nuevo virus pudo deberse al comercio de cerdos vivos, entre Europa y Estados Unidos, esto pudo propiciar la mezcla de algunos virus y el rearreglo de los mismos para el surgimiento de esta cepa, los virus pandémicos del siglo XX se originaron en humanos o en cerdos (Smith y col., 2009). El cerdo en las células epiteliales de su tráquea tiene receptores tanto para los virus humanos como para los virus aviares, por lo que proporciona una buena oportunidad para la recombinación (Newmann y col., 2009).

Tratamiento y Prevención

Para la prevención de la influenza se utiliza la vacunación como método primario. La vacuna se elabora con virus inactivados, las vacunas normalmente contienen HAs de tres tipos: dos de virus A y una de B. Los virus se cultivan en huevos y posteriormente se purifican y se inactivan haciendo que pierdan su infectividad (Newmann y col., 2009), las vacunas pueden cambiar periódicamente dependiendo de los virus que se presenten una región (Rovid, 2009), por lo que la vacunación debe ser anual, la elaboración de una vacuna para un virus emergente tarda de 3 a 6 meses (Bridges y col., 2002).

Una vez que la enfermedad se presenta se cuenta con dos tipos de drogas antivirales, los amantanos y los inhibidores de la neuraminidasa (Dawood y col., 2009). Dentro de los amantanos están la amantadina y la rimantadina que bloquean el canal iónico formado por la proteína M2, y de esta manera evitan el paso de iones hidrogeno a la vesícula endocítica, la acidificación es necesaria para se lleve a cabo la disociación de la proteína M1 y la liberación del complejo ribonucleoproteico (Piñón y col., 2005). Sin embargo, el uso de los

amadantanos se ha restringido debido a que tienen algunos efectos tóxicos, no tienen efectividad contra los virus de influenza B y la mayor parte de los virus humanos H1N1, H3N2, también los virus aviares H5N1, y los porcinos H1N1, H3N2 y H1N2, al igual que el A/H1N1 de 2009, han generado resistencia a este tipo de antivirales (Bridges y col., 2002).

Inhibidores de la Neuraminidasa

Los inhibidores de la neuraminidasa son el zanamivir y el oseltamivir, debido a que la neuraminidasa tiene la función de cortar las uniones del ácido siálico y la hemaglutinina, estas drogas se mimetizan con el sustrato e interfieren con la liberación de la progenie viral (Gubareva, 2004), y de esta manera evitan que los viriones puedan invadir nuevas células, previenen la digestión del ácido neuramínico del mucus y reduce la habilidad del virus de colonizar el epitelio respiratorio (Democratis y col., 2006); a diferencia de los amadantanos los inhibidores de la neuraminidasa son poco tóxicos y el desarrollo de resistencia es lento, el zanamivir es un derivado deshidratado del ácido siálico, este antiviral debe inhalarse, y el oseltamivir es un profármaco oral del carboxilato de oseltamivir que es el compuesto activo, contiene en su estructura un anillo ciclohexano y se utiliza por vía oral (Moscona, 2005a). En la figura 4, se observan las similitudes estructurales de los inhibidores de la neuraminidasa con el ácido siálico.

El zanamivir tiene una biovariabilidad de 10% a 20%, es decir que del total de la dosis, del 10 al 20% se va a al sistema circulatorio; el 90% de la dosis inhalada es eliminada en la orina, la vida media en suero es de 2.5 a 5.1 horas, la dosis es de 10 mg dos veces al día por 5 días iniciando dentro de las 48 horas de presentarse síntomas, las dosis para niños son las mismas (Tanaka y col., 2009), como efectos adversos se ha relacionado con broncoespasmos

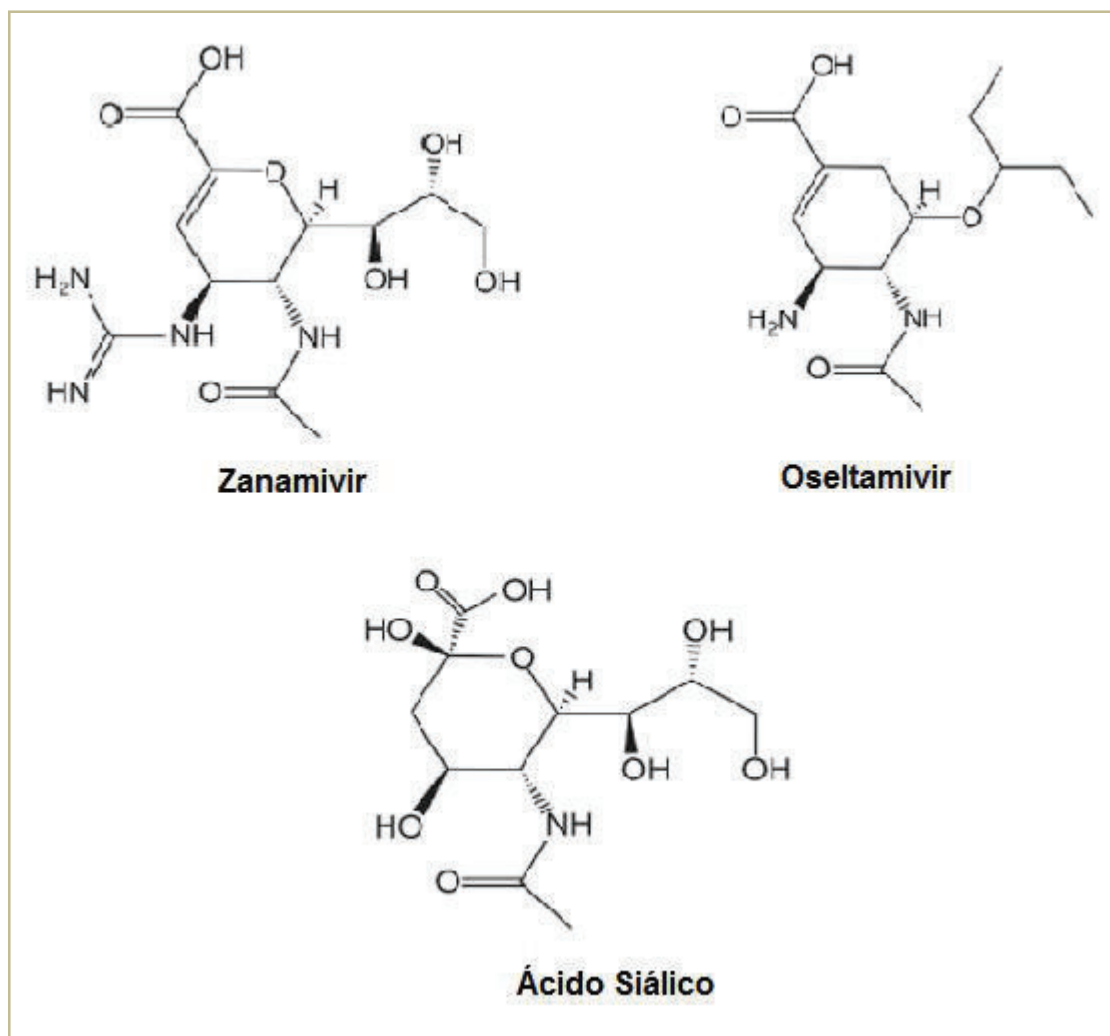


Figura 4. Estructuras del ácido siálico y los inhibidores de la neuraminidasa, zanamivir y oseltamivir.

Fuente: Adaptado de Das y col., 2010.

(Democratis y col., 2006), por lo que normalmente es utilizado como segunda opción de tratamiento.

El oseltamivir, es hidrolizado por el hígado a carboxilato de oseltamivir, la biovariabilidad de este es del 2%, tiene una vida media de 6 a 10 horas, la dosis en adultos es de 75 mg tomados dos veces al día por 5 días; en niños la dosis es de 2 mg/kg dos veces al día por 5 días (Tanaka y col., 2009). Como efectos adversos se observa leve incomodidad intestinal; este antiviral es utilizado como primera opción de tratamiento de influenza, esto puede contribuir a la resistencia que ha sido reportada, mientras que la resistencia para zanamivir se ha presentado en menor cantidad, la resistencia a los antivirales se genera por mutaciones que se presentan en el virus influenza (Democratis y col., 2006).

Mutaciones Asociadas con la Resistencia a Oseltamivir

Todas las variantes resistentes a oseltamivir de los virus influenza contienen mutaciones específicas en la neuraminidasa que le permiten la sobrevivencia del virus pero que no inactiva la función de la enzima, para la unión de oseltamivir a la neuraminidasa esta última tiene que reorganizarse formando una cavidad, mientras que para la unión de zanamivir no se requiere ninguna modificación en la estructura de la proteína, este puede ser un factor del por qué se ha desarrollado una mayor resistencia a oseltamivir, ya que algunas mutaciones evitan el arreglo proteico disminuyendo la capacidad de unión. La mutación E276 debe rotar y unirse con R224 para la formación de la cavidad, pero se ha visto que las mutaciones R292K, N294S y H274Y inhiben esta rotación y evitan la formación. Por otro lado, la mutación E119V es una mutación que confiere resistencia a oseltamivir y que no está implicada en la formación de la cavidad (Moscona, 2005b).

La mutación H274Y llamada así cuando se presenta en la N2, es conocida como H275Y en la N1, es la que se ha relacionado principalmente con la resistencia a oseltamivir (Hauge y col., 2009). Se ha observado que esta mutación reduce la capacidad de replicación y transmisión eficiente del virus, esta mutación se había encontrado en virus europeos que estuvieron circulando en 2007 y 2008 (Carr y col., 2008), y en algunos casos del virus A/H1N1 de 2009 se ha reportado resistencia (Memoli y col., 2010), y está en su mayoría se ha debido a la mutación H275Y (Wang y col., 2010), aun así esta resistencia ha sido muy limitada y el virus se sigue considerando susceptible a oseltamivir.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras

Los aislamientos virales fueron proporcionados amablemente por la Dra. Guadalupe Ayora Talavera del Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los virus fueron aislados en cultivo de la línea celular MDCK. Estos fueron identificados como virus A/H1N1 pandémico (2009), que se aislaron de pacientes de Centros de Salud de Yucatán. La resistencia al antiviral se determinó a través de un ensayo fenotípico que utiliza MU-NANA como sustrato, descrito por (Potier y col., 1979), con las modificaciones respectivas de acuerdo al protocolo utilizado por el CDC en Atlanta. Para la determinación de la resistencia al oseltamivir también se utilizó un ensayo quimioluminiscente, utilizando el kit NA-Star de Applied Biosystems. En total, se recibieron 7 aislamientos virales los cuales fueron identificados por cuestiones prácticas con la numeración del 1 al 7.

Inactivación de las Muestras

Al recibir las muestras, estas se inactivaron de acuerdo a la metodología utilizada por (Chan en 2006). Se trabajó en condiciones de bioseguridad II, en campana de flujo laminar BSC II AC (LABCONCO), en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C. (CIAD). En un tubo Eppendorf se agregaron 560 µl de solución amortiguadora de lisis AVL, se adicionaron 140 µl de la muestra, se mezclaron y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Lo anteriormente descrito se hizo en una campana de seguridad nivel 2, para las 7 muestras.

Extracción de RNA

Para la extracción de ARN se utilizó una columna de QIAamp de extracción de ARN de QIAGEN siguiendo las especificaciones del proveedor hasta resuspenderlo en 60 µl de solución amortiguadora AVE. Finalmente el ARN se almacenó a -70°C hasta su uso.

Preparación de Mezclas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizó el sistema One Step RT-PCR kit de QIAGEN, siguiendo las recomendaciones del fabricante para preparar la mezcla de reacción, se agregaron 5 µl de solución amortiguadora 5X, 0.8 µl de dNTP, 1.25 µl de MgCl₂, 1 µl de iniciador Na-0 Fw, 1 µl de iniciador Na-1452 Rv, 1 µl de la mezcla enzimática, 31.95 µl de agua y 8 µl de la muestra, que fue el RNA que se obtuvo en el paso anterior, la amplificación se llevó a cabo en el termociclador (TECHNE), las condiciones de PCR fueron las siguientes, 94°C por 3 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C 30 s, y 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 10 min. Una vez que se logró la amplificación del gen completo con el producto de PCR se realizó un PCR anidado. Para la mezcla de reacción se agregaron 10 µl de solución amortiguadora 5X, 0.8 µl de DNTP, 1.25 µl de MgCl₂, 1 µl de iniciador Na-726 Fw, 1 µl de iniciador Na-1452 Rv, 2 µl de la mezcla enzimática, 31.95 µl de agua y 2 µl de la muestra, que fue el DNA obtenido de la amplificación anterior.

Visualización de los Productos de la PCR

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, empleando “sybersafe” para identificar los productos de PCR. Se utilizaron 10 µl del producto de PCR, tanto el del gen completo de NA como el del PCR anidado, con su respectivo marcador de pares de bases (pb). Debido a que la mutación asociada a la resistencia al antiviral se encuentra en la posición 275 del gen NA, únicamente

se utilizaron los primers 726 Fw-1452 Rv que amplificarían un fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondiente a la región que incluyese el nucleótido 842 donde se encuentra la mutación antes mencionada.

Purificación de DNA

La purificación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones de la marca comercial Illustra GFX de General Electrics, de acuerdo a las especificaciones de la marca comercial. Se envió el producto purificado en alícuotas de 10 µl al Genetic Analysis and Technology Core de la Universidad de Arizona para su secuenciación, empleando los iniciadores descritos por la (WHO, 2009).

Análisis Genéticos

Una vez obtenidas las secuencias de los productos de PCR se analizaron utilizando el programa Chromas Lite. Posteriormente, se analizaron en el programa Nucleotide Blast de la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para alinearlos y confirmar que la secuencia correspondía al segmento 726-1452 del gen de la NA del virus influenza AH1N1. Posteriormente a la alineación se realizó la deducción de aminoácidos de las secuencias que si se alinearon, esto se hizo utilizando la herramienta en línea ExPasy proporcionada por el Instituto Suizo de Bioinformática. Con la secuencia de aminoácidos se realizó un alineamiento con las secuencias de aminoácidos de un virus resistente que fue el Influenza A virus (A/Mexico/InDRE797/2010(H1N1)) con clave de acceso en el Genbank de NCBI CY057074 y un virus susceptible Influenza A virus: A/Wisconsin/629-D01667/2009(H1N1) neuraminidase (NA) gene, complete cds con clave de acceso en el Genbank del NCBI CY090042. El alineamiento se realizó con el programa Bioedit. Mediante esta alineación se logró identificar la posición 275 y analizar si se encontraba la mutación H275Y en la neuraminidasa de los virus analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la amplificación del gen completo de la NA de las 7 muestras recibidas, esto se observa en la figura 5, en donde se pueden apreciar las bandas que corresponden al producto de PCR utilizando los iniciadores NA-0 Fw y NA-1452 Rv, para cada una de las muestras recibidas. Las bandas presentaron un tamaño aproximado a 1400 pb, lo que nos indica que la primera amplificación se realizó correctamente.

Posteriormente, se realizó un PCR anidado del producto anterior para amplificar el segmento de DNA que incluyera el sitio de la mutación H275Y esto se muestra en la figura 6.

Con excepción de las muestras 6 y 7, cuyo producto resulto insuficiente para está amplificación, únicamente se continuó trabajando con las primeras 5 muestras. El resultado del PCR anidado se señala en la figura 5, en donde se observan bandas de aproximadamente 700 pb para cada una de las 5 muestras.

El resultado obtenido de la secuenciación de 4 de las 5 muestras enviadas a los GATC de la Universidad de Arizona, se presenta en la tabla II, la secuencia correspondiente a la muestra 4, no se encontraba en buenas condiciones y por tanto no se consideró para el análisis de los resultados. La secuencia de nucleótidos de la muestra 1 tuvo una extensión de 692 pb, la de la muestra 2 fue de 462 pb, la de la muestra 3 fue de 676 pb, la de la muestra 5 fue de 672 pb.

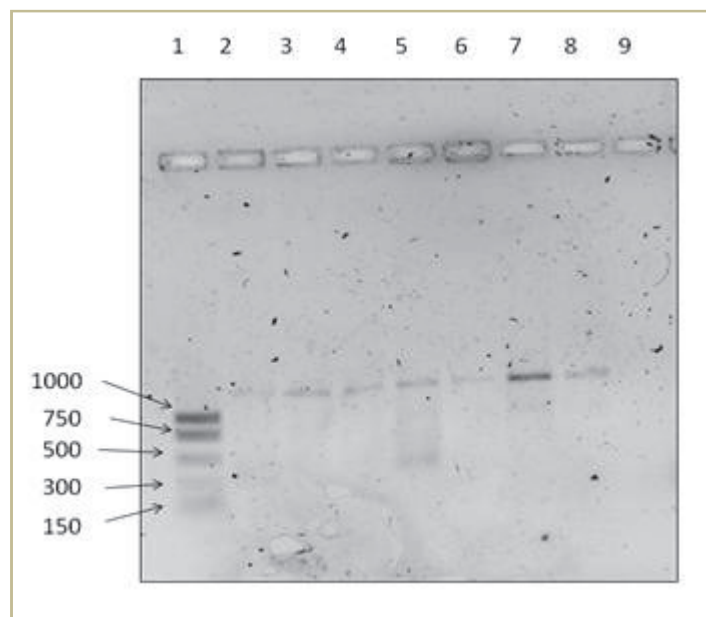


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con el producto de PCR utilizando los iniciadores NA-0 Fw y NA-1452 Rv. En el carril 1 se encuentra el marcador de pares de bases, en el carril 2 el amplicón de la muestra 1, en el carril 3 el amplicón de la muestra 2, en el carril 4 el amplicón de la muestra 3, en el carril 5 el amplicón de la muestra 4, en el carril 6 el amplicón de la muestra 5, en el carril 7 el amplicón de la muestra 6, en el carril 8 el amplicón de la muestra 7, en el carril 9 el control negativo.

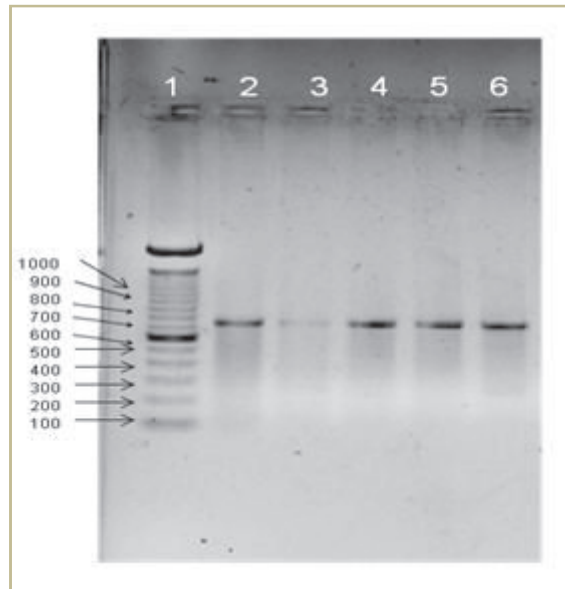


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con el producto de PCR anidado utilizando los iniciadores NA-726 Fw y NA-1452 Rv. En el carril 1 se encuentra el marcador de pares de bases, en el carril 2 el amplicón de la muestra 1, en el carril 3 el amplicón de la muestra 2, en el carril 4 el amplicón de la muestra 3, en el carril 5 el amplicón de la muestra 4, en el carril 6 el amplicón de la muestra 5.

Tabla II. Secuencias de nucleótidos del gen de NA, obtenidas de cada muestra, amplificando con los iniciadores NA-726 Fw y NA-1452 Rv.

Muestra	Secuencia de Nucleótidos
1	ATCCTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATG CCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGA AATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTG GGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGT GGGATTTTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGT GTCCAGTATCGTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCA AATACGGCAATGGTGTGGATAGGGAGAACTAAAAGCATTAGTTCAAG AAACGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGGACAGA CAATAAATTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAAATGAGTGGTCA GGATATAGCGGGAGTTTTGTTGAGCATCCAGAATAACAGGGCTGGAT TGATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGATCCAAA GAGAACACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTA AACAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCA TTTACCATTGACAAGTAATTTGTTCAAAAACCTCCTTGTTTCTACTGGTC ATAGCTGTTTCC
2	CACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTAATG GAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGGT GATAGGGGAGAATAAAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAGATGATT TGGGATCCGAACGGATGGACTGGGACAGACAATAACTTCTCAATAAAG CAAGATATCGTAGGAATAAATGAGTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTT GTTCAGCATCCAGAATAACAGGGCTGGATTGTATAAGACCTTGCTTCT GGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAACAATCTGGACTA GCGGGAGCAGCGTATCCTTTTGTGGTGTAACAGTGACACTGTGGGTT GGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTGACAAGTAATT TGTTCAAAAACCTCCTTGTTTCTACTGGTCATAGCTGTTTCTGA
3	ATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATG CCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGA AATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTG GGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGT GGGATTTTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGT GTCCAGTATCGTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCA AATACGGCAATGGTGTGGATAGGGAGAATAAAGCATTAGTTCAAG AAACGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGGACAGA CAATAAATTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAAATGAGTGGTCA GGATATAGCGGGAGTTTTGTTGAGCATCCAGAATAACAGGGCTGGAT TGATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGATCCAAA GAGAACACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTA AACAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCA TTTACCATTGACAAGTAATTTGTTCAAAAACCTCCTTGTTTCTACTGGTC ATAGCTGTTTCC

Tabla II. Secuencias de nucleótidos del gen de NA, obtenidas de cada muestra, amplificando con los iniciadores NA-726 Fw y NA-1452 Rv. (Continuación)

Muestra	Secuencia de Nucleótidos
5	GGATTCTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAA TGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGT GAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCG TGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCACATAGGATACATATGCA TTGGGGTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTT GTGGTCCAGTATCGTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAGGATTTTCATT CAAATACGGCAATGGTGTGGATAGGGAGAACTAAAAGCATTAGTTCA AGAAACGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGGACA GACAATAACTTCTCAATAAAGCAAGATATTGTAGGAATAAATGAGTGGT CAGGATATAGCGGGAGTTTTGTTCCAGCATCCAGAATAACAGGGCTGG ATTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAA AGAGAACACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTTGTGGTGT AACAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCC ATTTATCATTGACAAGTAATTTGTTCAAAAACTCCTTGTTTCTACTGGT CATAGCTGTTTCCT

La búsqueda de la mutación H275Y requería analizar la secuencia de aminoácidos, por lo que las secuencias de nucleótidos obtenida se tradujeron a su correspondiente secuencia de aminoácidos como se observa en la tabla III.

La alineación de las secuencias de aminoácidos de cada muestra con la de un virus susceptible a oseltamivir y con la de un virus resistente a este antiviral, realizada con el programa Bioedit, nos muestra que ninguna de las muestras presentó la mutación H275Y, la posición de la mutación se esquematiza en la figura 7.

Existen otras mutaciones que se asocian con la resistencia a los inhibidores de la NA, aunque la H275Y sigue siendo la que se presenta mayormente. Le y col. en 2008, reportaron una mutación en la posición 117 en la que se cambia una isoleucina por una valina (I117V), y que confiere una reducción en la susceptibilidad al oseltamivir. Otros trabajos también han reportado la presencia de mutaciones en la posición Q313R y I427T relacionadas con la resistencia a oseltamivir en ausencia de la mutación H275Y (Gubareva y col. en 2010). Así mismo, Rousset y col. en 2010 reportaron la presencia de un cambio de una isoleucina por una arginina en la posición 223 de la proteína NA (I223R), confiriendo resistencia tanto a oseltamivir como a zanamivir. De igual manera, otras dos mutaciones reportadas que han sido asociadas a la resistencia a oseltamivir son la D151V y la D197E (Okomo y col. en 2010).

A pesar de que no se detectó en ninguna de las muestras la mutación H275Y, debido a que se han descrito otras mutaciones asociadas con la resistencia al antiviral, se trató de identificar alguna otra mutación que pudiese estar asociada a la resistencia. Sin embargo, del fragmento amplificado únicamente se detectaron las mutaciones que se muestran en la tabla IV.

Tabla III. Secuencia de aminoácidos de la proteína neuraminidasa.

Muestra	Secuencia de aminoácidos
1	ILRIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSYCPDSSEITCVCRDNWHGSRNPW VSFNQNLEYQIGYICSGIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFK YNGVWIGRTKSISRNGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVGINEWSG YSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRSKENTIWTSGSSISFCGVNSD TVGWSWPDGAELPFTIDK-FVQKTPCFY
2	RPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYNGVWIGRTKSISRNGFEMI WDPNGWTGTDNNFSIKQDIVGINEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFW VELIRGRPKENTIWTSGSSVSFCGVNSD TVGWSWPDGAELPFTIDK- FVQKTPCFY
3	IFRIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSYCPDSSEITCVCRDNWHGSRNPW VSFNQNLEYQIGYICSGIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFK YNGVWIGRTKSISRNGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVGINEWSG YSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRSKENTIWTSGSSISFCGVNSD TVGWSWPDGAELPFTIDK-FVQKTPCFY
5	RIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSYCPDSSEITCVCRDNWHGSRNPWVS FNQNLEYHIGYICIGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKY NGVWIGRTKSISRNGFEMIWDPNGWTGTDNNFSIKQDIVGINEWSGYS GSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKENTIWTSGSSISFCGVNSD TV GWSWPDGAELPFIIDK-FVQKTPCFY

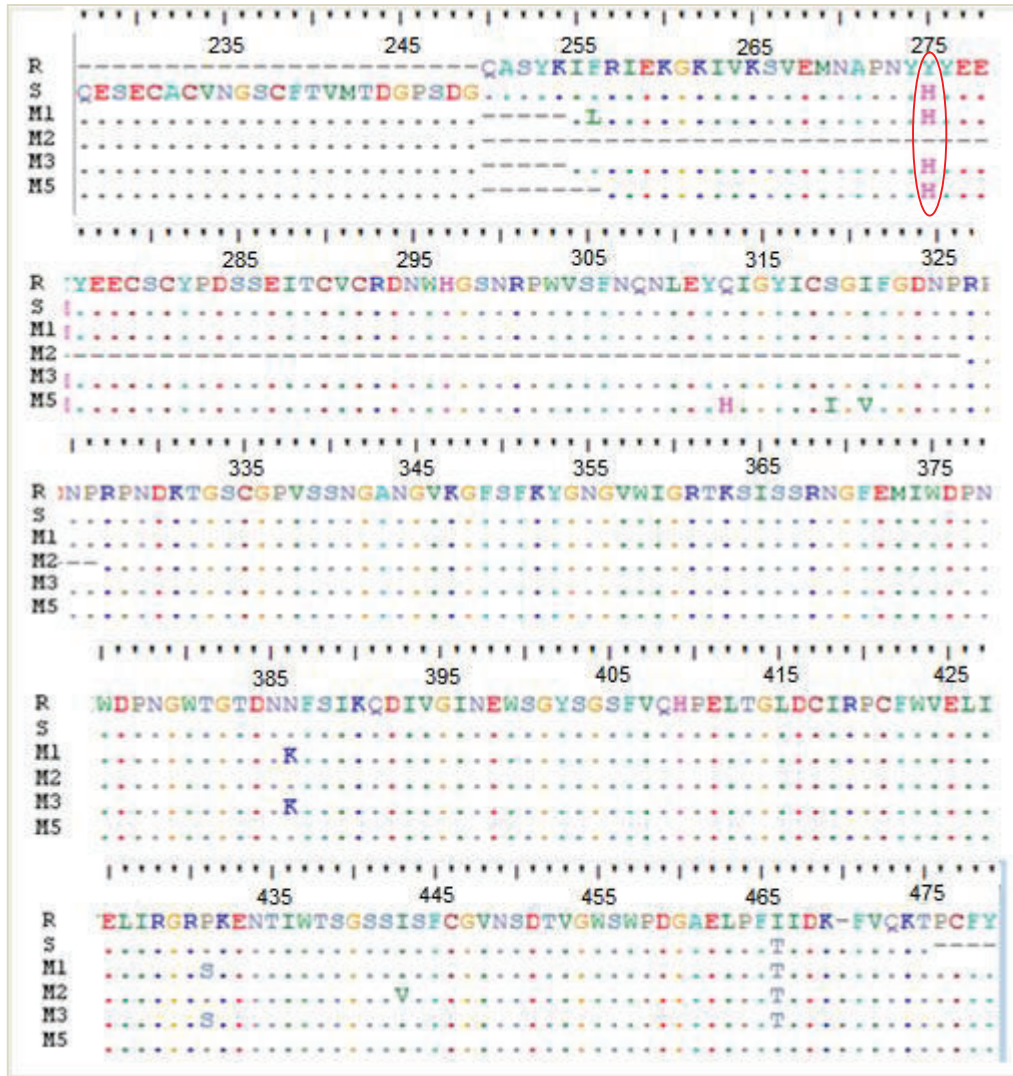


Figura 7. Alineación de aminoácidos con un virus resistente y un virus susceptible con las muestras analizadas. La posición 275 está marcada con un círculo rojo.

Tabla IV. Mutaciones detectadas en el gen de la NA de las muestras analizadas.

Muestra	Mutación con respecto al virus resistente
1	F256L N386K P431S I466T
2	I443V I466T
3	N386K I466T
5	Q311H S317I I319V

Es importante mencionar que el análisis fenotípico utilizando el sustrato MU-NANA o el ensayo quimioluminiscente, que se realizó previamente en las muestras, indicó que aquellas identificadas como 1 y 3 tenían valores de concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) hasta 4 veces el valor del IC_{50} del virus susceptible. Considerándolas así como virus con susceptibilidad reducida al antiviral.

En este estudio, no se encontró ninguna de las mutaciones previamente reportadas que se han asociado con la resistencia a oseltamivir, pero se encontraron otras mutaciones como la N386K, que se presenta en dos de las cuatro secuencias analizadas. Así mismo, la mutación I466T que comparten las muestras 1, 2 y 3, también se presenta en el virus susceptible. Por otro lado, las mutaciones F256L, P431S, I443V, Q311H, S317I, I319V, sólo se detectaron una vez en cualquiera de las muestras.

Una observación que se ha hecho por otros autores (Rousset y col. en 2010; Gubareva y col. 2010), y que se comparten en este trabajo, es que algunas de las muestras analizadas en este estudio presentan el cambio de una isoleucina por algún otro aminoácido. Lo que pareciese indicar que el aminoácido isoleucina es fácilmente intercambiable en la secuencia de aminoácidos del gen de la NA. Para resumir lo antes descrito, en la tabla V se señalan las mutaciones diferentes a H275Y que se han reportado en otros trabajos asociadas a la resistencia y las mutaciones que se encontraron en este estudio.

El sitio catalítico de la enzima neuraminidasa está conformado por los residuos R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, Y406, y la interacción con el sustrato está determinado por los residuos E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294, E425, como se muestra en la figura 8 (Yen y col., 2006). Todas las mutaciones que se encontraron en las muestras

Tabla V. Listado de mutaciones, en donde se presentan las mutaciones que ya se han reportado y que se asocian a la resistencia y las que se detectaron en este estudio.

Mutaciones encontradas en la NA, en el presente estudio que podrían estar relacionadas con la resistencia.	Mutaciones reportadas que se han asociado a la resistencia
F256L	I117V (Le y col., 2008)
N386 K	Q313R (Rousset y col., 2010)
P431S	I427T (Rousset y col., 2010)
I443V	I223R (Okomo y col., 2010)
Q311H	
S317I	
I319V	

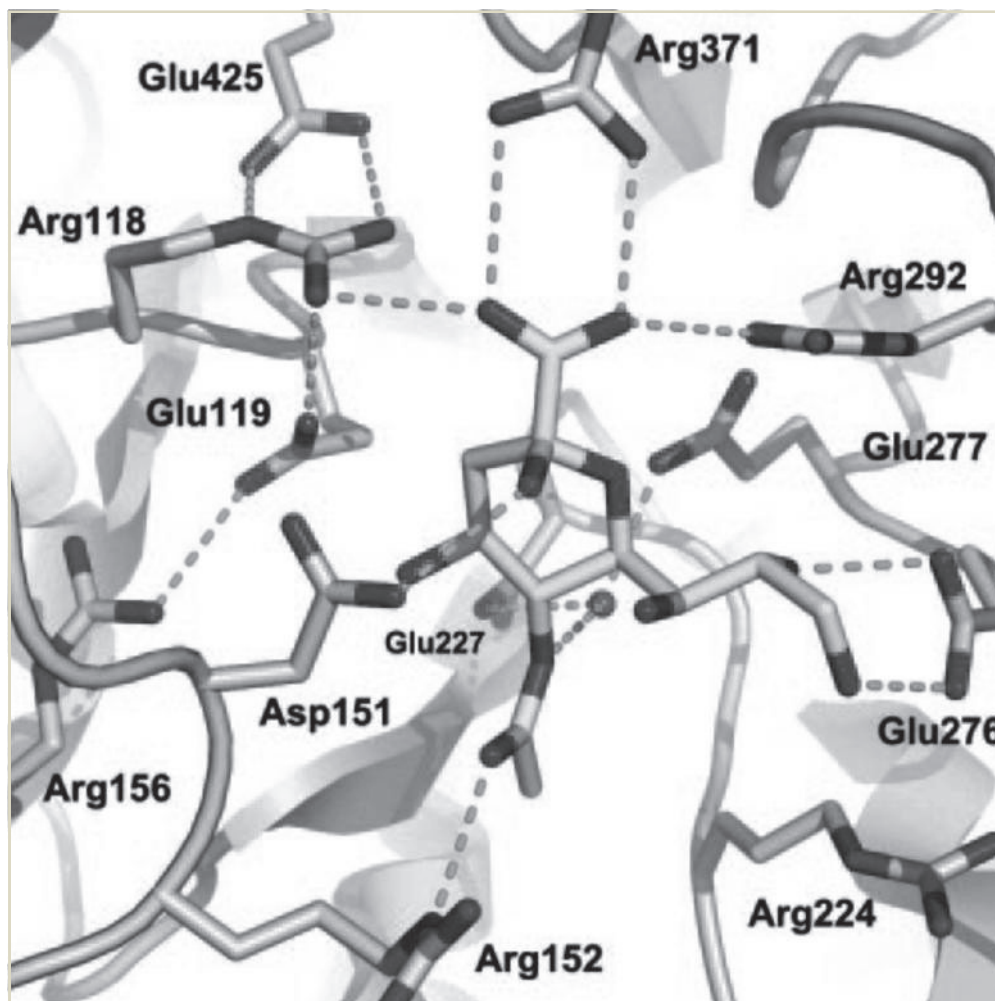


Figura 8. Sitio activo de la neuraminidasa (NA). En esta imagen se observan los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo interaccionando con el sustrato.

Fuente: Yen y col., 2006.

analizadas, están cerca del sitio activo y de los aminoácidos que interactúan con el sustrato.

CONCLUSIONES

Al analizar las secuencias de los virus A/H1N1 pandémicos analizadas en este trabajo mostraron que ninguna de ellas presentó la mutación H275Y, por lo que la resistencia al oseltamivir en estos casos particulares no se debe a esta mutación.

La resistencia que presentan los virus analizados puede deberse a alguna mutación en una posición diferente a la 275 dentro de la proteína NA.

Se detectaron otras mutaciones, todas las mutaciones que se encontraron en las muestras analizadas, están cerca del sitio activo y de los aminoácidos que interactúan con el sustrato. Esto podría explicar la resistencia presentada por las muestras analizadas. Sin embargo, para poder atribuir completamente la resistencia a las mutaciones identificadas se requiere el análisis completo del gen NA de cada una de los virus analizados en este estudio.

REFERENCIAS

- Agencia noticiosa CNN, 2010, tomado de:
(<http://mexico.cnn.com/salud/2010/08/10/la-oms-anuncia-el-fin-de-la-pandemia-por-ah1n1-despues-de-14-meses>)
- Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., Muller, C.W., Ruigrok, R.W.H., Baudin, F. 2003. Crystal structure of the M1 protein binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J.* 22(18): 4646-4655.
- Banks, J., Speidel, E.S., Moore, E., Plowright, L., Piccirillo, A., Capua, I., Cordioli, P., Fioretti, A., Alexander, D.J. 2001. Changes in the hemagglutinin and neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch virol.* 146: 963-973.
- Belshe, R.B. 2005. The Origins of Pandemic Influenza-Lessons from the 1918 Virus. *N Engl J Med.* 353 (21): 2209-2211.
- Bhoumik, P., Hughes, A.L. 2010. Reassortment of ancient neuraminidase and recent hemagglutinin in pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis.* 16: 1-7.
- Bridges, C.B., Fakunda, K., Uyeki, T.M., Cox, N.J., Singleton, J.A. 2002. Prevention and control of influenza. Recommendations of the advisory committee on immunization practice (ACIP). *MMWR.* 51(3): 1-36.
- Carr, M.J., Sayre, N., Duffya, M., Connella, J., Hall, W.W. 2008. Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. *J Viromet.* 153(2): 257-262.
- Chan, C.H., Lin, K.L., Chan, Y., Wang, Y.L., Chi, Y.T., Tu, H.L., Shieh, H.K., Liu, W.T. 2006. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Viromet.* 136: 38-43.

- Chowell, G., Echevarría-Zuno, S., Viboud, C., Simonsen, L., Tamerius, J., Miller, M.A., Borja-Aburto, V.H. 2011. Characterizing the epidemiology of the 2009 influenza A/H1N1 pandemic in Mexico. *Plos medicine*. 8(5): 1-13.
- Das, K., Aramini, J.M., Ma, L.C., Krug, R.M., Arnold, E. 2010. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nature Structural and Molecular Biology*. 17: 530–538.
- Dawood, S.F., Jain, S., Finely, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.V., Xu, X., Bridges, C.B., Uyeki, T.M. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 360: 2605-15.
- Democrat, J., Pareek, M., Stephenson, I. 2006. Use of neuraminidase inhibitors to combat pandemic influenza. *JAC antiviral*. 58: 911-915.
- Fodor, E., Crow, M., Mingay, L.J., Deng, T., Sharps, J., Fechter, P. 2002. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *JVI*. 76(18): 8989-9001.
- Fraser, C., Donnelly, C.A., Cauchemez, S., Hanage, W.P., Van Kerkhove, M.D., Hollingsworth, T.D., Griffin, J., Baggaley, R.F., Jenkins, H.E., Lyons, E.J., Jombart, T., Hinsley, W.R., Grassly, N.C., Balloux, F., Ghani, A.C., Ferguson, N.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C.M., Bojorquez, C.I., Palacios, Z.E., Espejo, G.D.M., Checchi, F., Garcia, E., Hugonnet, S., Roth, C. 2009. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science*. 324(5934): 1557-1561.
- Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W.M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C.B., Emery, S.L., Hillman, M.J., Rivaller, P., Smagala, J., Graaf, M., Burke, D.F., Fouchier, R.A.M., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C.M., López-Gatell, H., Olivera, H., López, I., Myers, C.A., Faix, D., Blair, P.J., Yu, C., Keene, K.M., Dotson, P.D., Boxrud, D., Sambol,

- A.R., Abid, S.H., St. George, K., Bannerman, T., Moore, A.L., Stringer, D.J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G.J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H.F., Belongia, E.A., Clark, P.A., Beatrice, S.T., Donis, R., J., Finelli, L., Bridges, C.B., Shaw, M., Jernigan, D.B., Uyeki, T.M., Smith, D.J., Klimov, A.I., Cox, N.J. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 325(5937): 197-201.
- Gubareva, L.V. 2004. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virusres*. 103: 199-203.
- Gubareva, L., Nguyen, H., Sleeman, K. 2010. Comprehensive assessment of the drug susceptibility of 2009 H1N1 influenza viruses. Paper O-821. Proceedings of Options for the Control of Influenza VII; 3-7 Sept; Hong Kong SAR, China.
- Gulsah, G., Astrid, H., Hans-Dieter, K. 2008. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin α 1 is a determinant of host range of influenza A virus. *Plos pathog*. 4: 1-10.
- Hauge, S.H., Dudman, S., Borgen, K., Lackenby, A., Hungnes, O. 2009. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg infect dis*. 15(2): 155-162.
- Hayden, F.G. 2009. Antiviral resistance in influenza viruses: clinical and epidemiological aspects. *Antimicrobials Drug Resistance. Infectious disease*. Ed. Mayers. Virginia, USA. 1011-1033.
- Jofré, M.L. 2007. Virus respiratorios emergentes. *Neumol pediatri*. 2(3): 130-134.
- Karlsson, H.G.B., Fouchier, R.A.M., Phogat, S., Burton, D.R., Sodroski, J., Wyatt, R.T. 2008. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nrmicro*. 6: 143-155.
- Kawaoka, Y. 2006. *Influenza virology current topics*. Caister academic press. England.

- Le, M.T.Q., Wetheim, H.F.L., Nguyen, H.D., Taylor, W., Hoang, P.V.M., Vuong, C.D., Nguyen, H.L.K., Nguyen, H.H., Nguyen, T.Q., Nguyen, T.V., Van, T.D., Ngoc, B.T., Bui, T.N., Nguyen, B.G., Nguyen, L.T., Luong, S.T., Phan, P.H., Pham, H.V., Nguyen, T., Fox, A., Nguyen, C.V., Do, H.Q., Crusat, M., Farrar, J., Nguyen, H.T., Jong, M.D., Horby, P. 2008. Influenza A H5N1 clade 2.3.4 virus with a different antiviral susceptibility profile replaced clade 1 virus in humans in northern Vietnam. *Plos one*. 3(10): 3339.
- Li, Q., Qi, J., Zhang, W., Vavricka, C.J., Shi, Y., Wei, J., Feng, E., Shen, J., Chen, J., Liu, D., He, J., Yan, J., Liu, H., Hiang, H., Teng, M., Li, X., Gao, G.F. 2010. The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site. *Nature structural and molecular biology*. 1-3.
- Luchsinger, V. 2009. Características del virus influenza y diagnóstico de laboratorio. *Neumol pediátr*. 4(1): 3-5.
- Ma, K., Roy, A.M.M., Whittaker, G.R. 2001. Nuclear export of influenza virus nucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology*. 282: 215-220.
- Martin, M., Hans, W.D., Jindrich, C.J. 2009. Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door. *Med Microbiol Immunol*. 198: 175-183.
- Medina, R.A., Garcia-Sastre, A. 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nrmicro*. 9: 590-603.
- Memoli, M.J., Hrabal, R.J., Hassantoufighi, A., Eichelberger, M.C., Taubenberger, J.K. 2010. Rapid selection of oseltamivir and peramivir resistant pandemic H1N1 virus during therapy in 2 immunocompromised hosts. *Clin infect dis*. 50(9): 1252-1255.
- Moscona, A. 2005a. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N Engl J Med*. 353: 1363-73.
- Moscona, A. 2005b. Oseltamivir resistance-disabling our influenza defenses. *N Engl J Med*. 353: 2633-2636.

- Newmann, G., Noda, T., Kawaoka, Y. 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 459: 931-939.
- Okomo-Adhiambo, M., Sleeman, K., Ballenger, K., Nguyen, H.T., Mishin, V.P., Sheu, T.G., Smagala, J., Li, Y., Klimov, A.I., Gubareva, L.V. 2010. Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: a laboratory surveillance perspective. *Viruses*. 2(10): 2269-2289.
- Piñón-Ramos, A., Oropesa-Fernández, S., Aragonés-López, C., Galindo, B., Acosta-Herrera, B., Hernández-Espinosa, B. 2005. Influenza y vacunación. *Rev Biomed*. 16: 45-53.
- Plotkin, J.B., Dushoff, J., Levin, S.A. 2002. Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. *PNAS*. 99(9): 6263-6268.
- Potier, M., Beauregard, M., Bélisle, L., Mameli, V., Nguyen, H.V., Melancon, S.B., Dallaire, L. 1979. Neuraminidase activity in the mucopolidoses (types I,II and III) and the cherry-red spot myoclonus syndrome. *Clinica chimica acta*. 99(2): 97-105.
- Rousset, D., Le Goff, J., Abou-Jaoude, G., Molina, J.M., Scemla, A., Caro, V., Enouf, V., Simon, F., van der Werf, S. 2010. Emergence of successive mutations in the neuraminidase of the pandemic H1N1 virus respectively associated with oseltamivir resistance and reduced susceptibility to both oseltamivir and zanamivir under treatment with neuraminidase inhibitors. Paper P-198. Proceedings of Options for the Control of Influenza VII; 3-7 Sept; Hong Kong SAR, China.
- Rovid, S.A. 2009. Influenza. *Cfsph*. 1-46.
- Salomon, R., Webster, R.G. 2009. The influenza virus enigma. *Cell*. 136: 402-410.
- Secretaria de salud. 2009. Tomado de: <http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza/estadisticas.html>

- Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S.M., Guan, Y., Rambaut, A. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A pandemic. *Nature*. 459: 1122-1125.
- Talledo, M. Zumaeta, K. 2009. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Rev Peru Biol*. 16(2): 227-238.
- Tanaka, T., Nakajima, K., Murashima, A., Garcia-Bournissen, F., Koren, G., Ito, S. 2009. Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *Cmaj*. 181: 55-58.
- Vaqué, R.J., Gil, C.J., Brotons, A.M. 2009. Principales características de la pandemia por el nuevo virus influenza A (H1N1). *Med Clin (Barc)*.133(13): 513-521.
- Vega, B.R.S., Reyes-Terán, G. 2007. El virus de la influenza. *Nct*. 66: 12-14.
- Wang, B., Dwyer, D.E., Blyth, C.C., Soedjono, M., Shi, H., Kesson, A., Ratnamohan, M., McPhie, K., Cunningham, A.L., Saksen, N.K. 2010. Detection of the rapid emergence of the H275Y mutation associated with oseltamivir resistance in severe pandemic influenza virus A/H1N1 09 infections. *Antiviral res*. 87: 16-21.
- WHO, 2009, tomado de: [GenomePrimers_20090512.pdf](#).
- WHO, 2011, tomado de: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2011_07_29_weekly_web_update_oseltamivir_resistance.pdf.
- Wrammert, J., Koutsonanos, D., Li, G., Edupuganti, S., Sui, J., Morrissey, M., McCausland, M., Skountzou, I., Hornig, M., Lipkin, W.I., Mehta, A., Razavi, B., Del Rio, C., Zheng, N.Y., Lee, J.H., Huang, M., Ali, Z., Kaur, K., Andrews, S., Amara, R.R., Wang, Y., Das, S.R., O'Donnell, C.D., Yewdell, J.W., Subbarao, K., Marasco, W.A., Mulligan, M.J., Compans, R., Ahmed, R., Wilson, P.C. 2011. Broadly cross-reactive antibodies dominate the

human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *JEM*. 208(1): 181-193.

Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol rev*. 56: 152-179.

Yen, H.L., Hoffmann, E., Taylor, G., Scholtissek, C., Monto, A.S., Webster, R.G., Govorkova, E.A. 2006. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol*. 80(17): 8787-8795.