

# Detección del virus influenza pandémica A (H1N1) en Paraguay 2009, y amplificación de genes hemagglutinina y neuraminidasa

## *Detection of pandemic influenza A (H1N1) virus in Paraguay in 2009, and amplification of the hemagglutinin and neuraminidase genes*

Espínola EE<sup>(1)</sup>, Martínez M<sup>(1)</sup>, Russomando G<sup>(1)</sup>, Nara E<sup>(1)</sup>, Amarilla AA<sup>(1,3)</sup>, Aquino VH<sup>(4)</sup>, Gómez C<sup>(2)</sup>, Cuellar G<sup>(2)</sup>, Rodas J<sup>(2)</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** El virus de influenza pandémica A (H1N1), cuya circulación se inició en abril del año 2009 en México y Estados Unidos, se constituyó en el último virus pandémico desde los casos detectados en Hong Kong en 1968. El genoma del virus de influenza A está formado por 8 segmentos ARN de cadena simple (polaridad negativa), que codifican para 10 proteínas. Los genes *hemagglutinina* y *neuraminidasa* codifican para dos proteínas de superficie y son los utilizados en los análisis de variabilidad genética. **Objetivos:** a) Detectar la circulación del virus pandémico en pacientes con sospecha clínica de infección por influenza, y b) Diseñar una estrategia para amplificar de forma completa los genes *hemagglutinina* y *neuraminidasa*. **Materiales y Métodos:** Fueron analizados por Real-Time RT-PCR (transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) un total de 181 muestras de hisopado faríngeo, colectadas o remitidas al Hospital de Clínicas, del 6 de agosto al 11 de octubre de 2009. Para el diseño de amplificación de los genes *hemagglutinina* y *neuraminidasa*, se han utilizado herramientas bioinformáticas y reacción en cadena de la polimerasa. **Resultados:** Del total de muestras analizadas, 27 (14.9 %) dieron resultado positivo para el nuevo virus pandémico. Por otra parte, la amplificación completa de ambos genes proporcionó los resultados esperados: 1678-pares de bases (pb) para la *hemagglutinina*, y 1427-pb para la *neuraminidasa*. **Conclusiones:** La implementación de esta tecnología de amplificación permitirá posteriormente la secuenciación de estos genes a fin de determinar las variaciones genéticas del virus que podrían tener un impacto en la salud humana.

**Palabras claves:** Influenza A (H1N1), gen hemagglutinina, gen neuraminidasa.

### ABSTRACT

**Introduction:** The pandemic influenza A (H1N1) virus, whose circulation was detected in April 2009 in Mexico and the United States, is the latest pandemic virus since the cases reported in Hong Kong in 1968. The genome of the influenza A virus consists of 8 segments of single-stranded RNA of negative polarity, coding for 10 proteins. The hemagglutinin and neuraminidase genes encode for two surface proteins and are used in the analysis of genetic variability. **Objectives:** a) to detect circulation of the pandemic virus in patients with clinical suspicion of influenza infection and b) design a strategy to fully amplify the hemagglutinin and neuraminidase genes. **Materials and Methods:** A total of 181 pharyngeal swabs were collected and sent to the *Hospital de Clínicas* for analysis using Real-Time RT-PCR (reverse transcription and polymerase chain reaction in real time) between 6 August and 11 October 2009. To design the amplification of hemagglutinin and neuraminidase genes, we used bioinformatic tools and polymerase chain reaction. **Results:** Of the samples analyzed, 27 (14.9%) were positive for the new pandemic virus. Moreover, the complete amplification of both genes provided the expected results: 1678-base pairs (bp) for the hemagglutinin, and 1427-bp for neuraminidase. **Conclusions:** The use of this technology for amplification will eventually allow sequencing to identify genetic variations of the virus that could have an impact on human health.

**Keywords:** Influenza A (H1N1) hemagglutinin gene, neuraminidase gene

1. Departamento de Biología Molecular y Genética, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

2. Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

3. Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

4. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

**Correspondencia:** Emilio Espínola. Río de la Plata y Lagerenza, CP 1120, Asunción, Paraguay. Tel.: +595 21 424 520. E-mail: emilioespinola@hotmail.com

Artículo recibido en octubre 2010 aceptado para publicación diciembre 2010.

Este trabajo fue realizado en el marco del Programa de Apoyo al Desarrollo de la Ciencia, Tecnología e Innovación en Paraguay (BID 1698/OC-PR) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## INTRODUCCIÓN

En abril de 2009 fue detectado un brote de enfermedad tipo influenza en México y Estados Unidos. Este virus fue caracterizado por el Center for Disease Control (CDC, Estados Unidos) como una nueva variante de influenza A, el cual se originó a través de eventos de reordenamiento de genes de influenza aviar, porcina y humana<sup>(1-3)</sup>. El nuevo virus se dispersó rápidamente, y para el 7 de mayo de 2009 el número de casos confirmados era de 2.099<sup>(4)</sup>. Debido a la rápida dispersión a nivel mundial del virus, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró alerta máxima (fase 6), constituyéndose en la última pandemia después de 1968 en Hong Kong.

Según la actualización de la OMS del 14 de febrero de 2010, más de 212 países habían reportado casos confirmados de influenza pandémica H1N1 por laboratorio, y 15.921 muertes<sup>(5)</sup>. En el año 2009, la Dirección General de Vigilancia de la Salud (DGVS) del Ministerio de Salud Pública del Paraguay declaró un total de 987 casos, y hasta el 11 de agosto del año 2010 se confirmaron 44 nuevos casos<sup>(6)</sup>.

Según datos de la OMS, fueron catalogados como grupos de riesgo de contraer infección por el virus influenza H1N1 los lactantes y niños pequeños (sobre todo los menores de dos años), embarazadas, personas de cualquier edad que padecen ciertas enfermedades crónicas (asma bronquial o neuropatías, cardiopatías, etc.), y personas portadoras de inmunodepresión grave.

Por otra parte, si bien a nivel mundial se vio que el número de casos registrados ha disminuido en el año 2010, no es posible descartar la reaparición de este virus pandémico, o la circulación de alguna cepa reordenante con características aun más patogénicas que la que ha circulado<sup>(7,8)</sup>. En el reporte de recomendaciones de diciembre de 2009, se ha solicitado mejorar la vigilancia, y la realización de un mayor esfuerzo en lograr nuevos desarrollos tecnológicos en biología molecular, entre otros.

El virus de influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae, compuesta por cuatro géneros: influenza A, B, C, y Thogovirus<sup>(9,10)</sup>. El virus de influenza A posee un material genético constituido por 8 segmentos de ARN de cadena simple (de polaridad negativa), que codifican para 10 proteínas<sup>(9)</sup>. La cubierta externa está compuesta por una envoltura de lípidos que se origina a partir de la membrana plasmática de las células infectadas, y dos glicoproteínas de superficie que sobresalen de la envoltura lipídica: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), que exhiben una mayor variabilidad a nivel de aminoácidos en comparación con sus demás proteínas constituyentes<sup>(9)</sup>. La variabilidad que muestran

los genes que codifican para las glicoproteínas HA y NA hace que sean una herramienta útil en los análisis filogenéticos de estos virus<sup>(11-14)</sup>. Dependiendo de las variantes a nivel antigénico de estas glicoproteínas de superficie, hasta la fecha se tienen 16 subtipos HA (H1-H16) y 9 subtipos NA (N1-N9), agrupándose en diferentes combinaciones<sup>(2,9)</sup>.

Con respecto al virus de influenza pandémica H1N1, la variante HA ha sido adquirida de porcinos americanos, mientras que la variante NA de porcinos europeos (aunque no se ha determinado el lugar exacto donde se produjo este reordenamiento)<sup>(10,12)</sup>. Además, se ha demostrado la existencia de variantes resistentes a los tratamientos antivirales mediante mutaciones específicas (por ejemplo, la mutación H275Y en la neuraminidasa ocasiona resistencia al oseltamivir). Estos hechos hacen resaltar la importancia de la vigilancia epidemiológica mediante la caracterización de las variantes virales de influenza a través de métodos como la detección de genes específicos del virus, o la secuenciación del material genético de los mismos.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) Detectar la circulación del virus pandémico en pacientes con sospecha clínica de infección con influenza, y b) Diseñar una estrategia para amplificar de forma completa los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* y permitir avances en el estudio detallado de las variaciones genéticas que éstos presentan.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras*

En el año 2009, fueron colectadas un total de 181 muestras de hisopados faríngeos de pacientes con sospecha clínica de infección con influenza, enfermedad tipo influenza (ETI), o neumonías graves, remitidas de otros centros o de aquellos que asistieron al Hospital de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción (UNA), del 6 de agosto al 11 de octubre. Dichas muestras fueron colectadas mediante la utilización de un hisopo sintético de Dacron® en 2 mL de Medio de Transporte Viral (BSA 0.5 %, penicilina 100 U/mL, gentamicina 100 U/mL, diluidas en PBS). Las muestras que fueron colectadas dentro de las 48 horas del inicio de los síntomas, o hasta 5 días en casos de gravedad, fueron mantenidas inicialmente a 4°C, sin congelar, hasta un máximo de 3 días antes de ser remitidas al Departamento de Biología Molecular y Genética (Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA), y

guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Todas fueron codificadas a fin de respetar la confidencialidad de datos de los pacientes; el resultado con el diagnóstico posterior fueron entregados sin costos para los mismos.

#### *Extracción de ARN*

El ARN fue extraído utilizando TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen), a partir de 300  $\mu\text{L}$  de muestra y siguiendo instrucciones del fabricante. El ácido nucleico fue finalmente resuspendido en 50  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC.

#### *Detección por RT-PCR en tiempo real*

El ARN extraído fue amplificado por transcripción reversa (RT), seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos, monitoreado en tiempo real utilizando un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: transcripción reversa a  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos para inactivar la enzima retrotranscriptasa, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos y extensión a  $55^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. La mezcla de reacción fue preparada en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , utilizando: 1) el AgPath-ID<sup>™</sup> One-Step RT-PCR Kit (Ambion); 2) cuatro pares de cebadores con sus respectivas sondas, utilizando el Influenza A 2009 H1N1 Assay Sets v1.0 (Applied Biosystems); y 5  $\mu\text{L}$  de ARN extraído.

Los cuatro pares de cebadores se utilizan para amplificar específicamente los genes *MA* (*matriz*) genérico de longitud 106-pares de bases (pb), *NP* (*nucleoproteína*) porcina de 195-pb, *HA* tipo 1 porcina de 116-pb, y un control interno humano *RNase P* de 65-pb.

#### *Diseño de cebadores para amplificar los genes hemaglutinina y neuraminidasa*

Una vez que las muestras fueron detectadas como positivas para influenza A (H1N1) por el método comercial arriba descrito, hemos diseñado nuevos cebadores para amplificar en forma completa los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* de esas muestras. Para ello, se procedió a la realización de una comparación bioinformática de los genes ya reportados en la base de datos Influenza Virus Resource, del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Las secuencias se eligieron en base a los siguientes criterios: 1) presencia de secuencias completas de los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa*, 2) circulación de las cepas en los años 2009 y 2010, y 3) que representen el aislamiento del virus a nivel mundial. Las secuencias fueron editadas manualmente utilizando el programa BioEdit v7.0.5.3<sup>(15)</sup> y alineadas con Clustal W.<sup>(16)</sup>

Posteriormente se buscaron secuencias flanqueantes en las posiciones 5' y 3' de cada gen, que cumplan con los siguientes requisitos: 1) una longitud de aproximadamente 20-pb, 2) presencia del dinucleótido G/C en el extremo 5', 3) un contenido GC de 30 % a 50 %, 4) ausencia de estructuras secundarias, verificadas con OligoCalc<sup>(17)</sup>, y 5) ausencia de apareamientos inespecíficos, verificados con el algoritmo blastn<sup>(18)</sup>. En total, se diseñaron cuatro cebadores (un par para cada gen). Estos cebadores fueron sintetizados químicamente por Sigma-Aldrich.

#### *Estandarización de la RT-PCR para los genes hemaglutinina y neuraminidasa*

Una vez que los cebadores fueron diseñados y sintetizados, se optimizaron las condiciones de amplificación de la PCR, para cada par de cebadores. Para este ensayo, fue utilizado un control positivo de influenza A (H1N1) de origen brasileño, a fin de buscar las mejores temperaturas. Se inició una RT en un volumen de 40  $\mu\text{L}$ , con los siguientes componentes: 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 4  $\mu\text{L}$  de cebadores randómicos (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de DTT (100 mM), 8  $\mu\text{L}$  de Buffer 5X First-Strand, 1  $\mu\text{L}$  de RNase OUT, y 1  $\mu\text{L}$  de enzima MMLV (200 U/ $\mu\text{L}$ ). Las condiciones de ciclado fueron:  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos,  $37^{\circ}\text{C}$  por 4 horas, y  $85^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

El ADN complementario producido por este método fue utilizado para la amplificación por PCR, en gradiente de temperaturas (de  $48^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$ ), a fin de establecer la temperatura óptima de apareamiento para cada par de cebadores. Las condiciones de ciclado fueron:  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguido de 45 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos,  $48^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, y  $68^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos. La extensión final fue a  $68^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, y finalización a  $4^{\circ}\text{C}$  *at infinitum*.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 2 %, teñidos con Bromuro de Etidio por 10 minutos, y visualizados a través de un transiluminador de rayos UV.

## RESULTADOS

De las 181 muestras analizadas, 46 (25.4 %) correspondieron a niños  $\leq 5$  años. Fueron detectados 27 casos de influenza A (H1N1), lo cual equivale al 14.9 % del total. Los aislados correspondieron a 4 muestras de niños  $\leq 5$  años, y 23 muestras correspondientes a pacientes mayores a 5 años. Del total de niños  $\leq 5$  años con síntomas de enfermedad tipo influenza ( $n=46$ ), el porcentaje de infectados por influenza A (H1N1) para este grupo etáreo correspondió al 8.7 %.

En este trabajo, fueron diseñados cuatro cebadores específicos para amplificar en forma completa los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* del virus influenza pandémica A(H1N1) (**Tabla 1**).

La posición de los cebadores en la secuencia completa de ambos genes puede ser visualizada en la **Figura 1**.

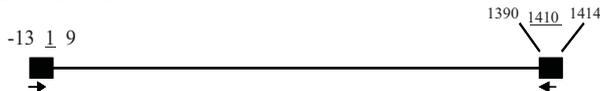
**Tabla 1:** Cebadores de amplificación para los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* del virus influenza pandémica A(H1N1).

Cebador	Gen	Posición	Sentido	Secuencia (5'→3')
InfHA1F	<i>Hemaglutinina</i>	6 al 25	Forward	GGCAATACTAGTA GTTCTGC
InfHA1R	<i>Hemaglutinina</i>	1664 al 1683	Reverse	CTGTAGAGACCCA TTAGAGC
InfNA1F	<i>Neuraminidasa</i>	-13 al 9	Forward	GCAGGAGTTTAAA ATGAATCC
InfNA1R	<i>Neuraminidasa</i>	1390 al 1414	Reverse	CAAATTACTTGTC AATGGTAAATGG

A. Gen hemaglutina



B. Gen neuraminidasa

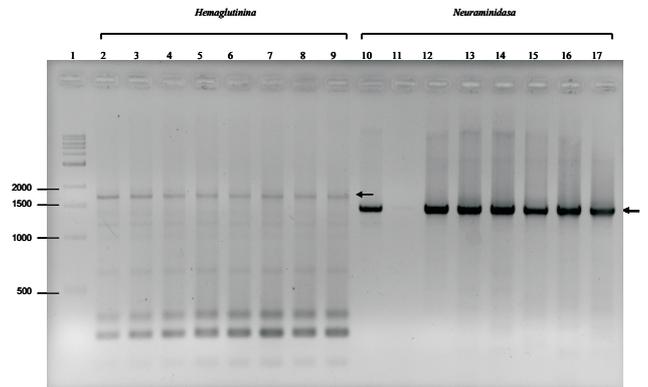


**Figura 1:** Posición de los cebadores diseñados (flechas) para el gen *hemaglutinina* (A), y *neuraminidasa* (B).

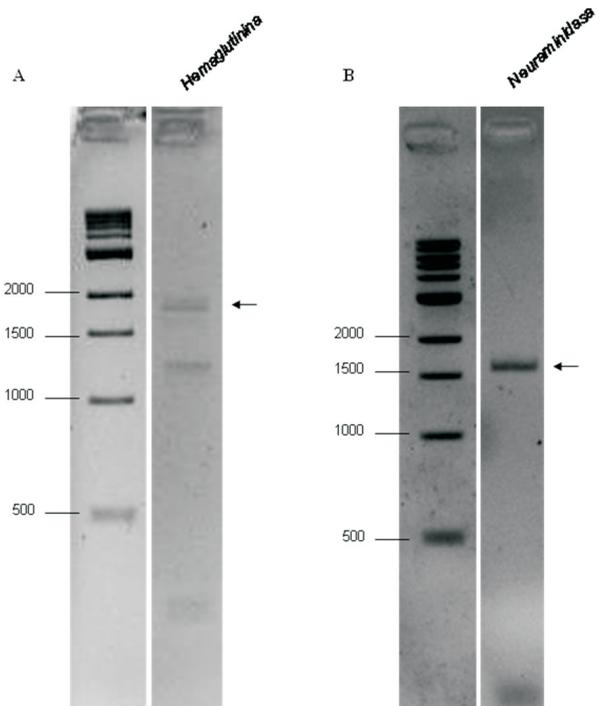
La numeración corresponde a secuencias de referencia depositadas en el GenBank (números de acceso CY054630 para la *hemaglutinina*, y CY060688 para la *neuraminidasa*). Los números subrayados simbolizan los nucleótidos de inicio y término de cada gen.

El uso de estos cebadores nos permitió amplificar satisfactoriamente los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* de este virus (**Figura 2**). Se obtuvo el tamaño deseado de los productos de amplificación para ambos genes, con 1678-pb para *hemaglutinina* y 1427-pb para *neuraminidasa*. El análisis de gradiente de temperaturas para optimizar el apareamiento de los cebadores permitió establecer las temperaturas más adecuadas. Hemos determinado que las temperaturas más adecuadas fueron de 60°C para los cebadores de la *hemaglutinina*, y de 52.4°C para los cebadores de la *neuraminidasa* (**Figura 2**).

Hemos aplicado esta misma metodología a una muestra de hisopado faríngeo, denominada 20HBO, aislada en Paraguay en el periodo de estudio descrito previamente, y logramos amplificar estos genes de forma satisfactoria (**Figura 3**).



**Figura 2:** Gel de agarosa 2% con productos de PCR para los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* (indicados con flechas), en gradiente de temperaturas de apareamiento de cebadores para cada grupo. Los carriles están marcados, de izquierda a derecha, como sigue: 1, marcador de peso molecular de ADN (longitud de nucleótidos); carriles 2-9, ensayo para el gen *hemaglutinina*, con temperaturas de 60/59.1/57.6/55.3/52.4/50.3/48.8/48°C; carriles 10-17, ensayo para el gen *neuraminidasa*, con las mismas temperaturas de apareamiento que las anteriores.



**Figura 3:** Gel de agarosa 2%, mostrando los productos de PCR (flechas) para los genes *hemaglutinina* (A) y *neuraminidasa* (B), de la muestra 20HBO aislada en Paraguay (2009) a partir del hisopado faríngeo previamente caracterizado por la presencia de influenza pandémica A (H1N1).

## DISCUSIÓN

Según datos reportados de casos de infección por influenza A (H1N1) en los países limítrofes de Paraguay, el porcentaje de detección en el año 2009 varió aproximadamente del 12 al 40 %<sup>(19-21)</sup>. Con respecto a los

porcentajes, en Argentina se reportó 34 % de casos entre junio/julio<sup>(19)</sup>, Brasil 40 % de casos entre junio/septiembre<sup>(21)</sup>, y Bolivia 12.7 % de casos entre mayo/agosto<sup>(20)</sup>. Según datos de la DGVS de Paraguay, el predominio de la circulación del virus influenza pandémica A (H1N1) en 2009 se registró en el periodo comprendido entre las semanas epidemiológicas 20 a 34 (17 de mayo a 29 de agosto), con un porcentaje del 75% de detección con respecto al total de los virus respiratorios reportados en ese periodo<sup>(22)</sup>. Por lo tanto, esto estaría en concordancia con la idea que las muestras incluidas en este estudio (6 de agosto al 11 de octubre) se situaron en la etapa de disminución de los casos reportados.

El segundo objetivo de este trabajo fue desarrollar una estrategia para amplificar los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* del virus influenza pandémica A (H1N1). Estos genes son utilizados corrientemente en los análisis de evolución molecular y epidemiología, a fin de establecer la circulación de variantes virales en poblaciones humanas<sup>(23)</sup>. Los cebadores diseñados en este trabajo permitieron amplificar de forma correcta a ambos genes, lo cual demostró que el diseño teórico adoptado fue correcto. Sin embargo, hemos observado la presencia de amplificaciones inespecíficas para el gen *hemaglutinina*. Esto podría deberse a apareamientos no específicos de uno de sus cebadores en regiones internas, lo cual produciría productos más pequeños.

En próximos trabajos, pretendemos utilizar el método de

Sanger<sup>(24)</sup> para secuenciar completamente los genes *hemaglutinina* y *neuraminidasa* de muestras de influenza A (H1N1) determinadas en este estudio. El equipo a ser utilizado para la realización de esta parte del trabajo obtiene electroferogramas de alta resolución de hasta 500 nucleótidos. Debido a que el tamaño de los genes de interés se encuentra en el rango de 1400 a 1700 nucleótidos, ya hemos diseñado nuevos cebadores internos (datos no mostrados), a fin de cubrir la longitud completa de los genes previamente amplificados.

La información obtenida en este estudio es de relevancia, debido a la necesidad de a) monitorear las variantes genéticas del virus en nuestro país y compararlas con las de la región, b) determinar la circulación de nuevas variantes virales en la población, y c) estar preparados a nivel nacional para hacer frente a un posible nuevo brote del virus.

## AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay, por la valiosa colaboración científica durante la última pandemia de influenza. Además, a los investigadores del Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Brasil, por el continuo apoyo en nuestros trabajos de investigación.

## REFERENCIAS

1. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et-al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009;325:197-201.
2. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009;459:931-939.
3. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et-al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009;459:1122-1125.
4. WHO. Influenza A (H1N1): update 19. Geneva: WHO; 2009.
5. WHO. Pandemic (H1N1) 2009: update 88. Geneva:WHO; 2010.
6. DGVS. Vigilancia de virus respiratorios, 11 de agosto. Asunción: DGVS; 2010.
7. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, et-al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 2009;325:484-487.
8. Munster VJ, de-Wit E, van-den-Brand JM, Herfst S, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, et- al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus in ferrets. *Science*. 2009;325:481-483.
9. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.p. 1487-1531.
10. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.p. 1533-1579.
11. Ahn I, Son HS. Comparative study of the nucleotide bias between the novel H1N1 and H5N1 subtypes of influenza A viruses using bioinformatics techniques. *J Microbiol Biotechnol*. 2010;20:63-70.
12. Babakir-Mina M, Dimonte S, Perno CF, Ciotti M. Origin of

- the 2009 Mexico influenza virus: a comparative phylogenetic analysis of the principal external antigens and matrix protein. *Arch Virol.* 2009;154:1349-1352.
13. Ding N, Wu N, Xu Q, Chen K, Zhang C. Molecular evolution of novel swine-origin A/H1N1 influenza viruses among and before human. *Virus Genes.* 2009;39:293-300.
14. Qi X, Pang B, Lu CP. Genetic characterization of H1N1 swine influenza A viruses isolated in eastern China. *Virus Genes.* 2009;39(2):193-99.
15. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *NuclAcids Symp Ser.* 1999;41:95-98.
16. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-4680.
17. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W43-46.
18. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-3402.
19. Farias JA, Fernandez A, Monteverde E, Vidal N, Arias P, Montes MJ, et-al. Critically ill infants and children with influenza A (H1N1) in pediatric intensive care units in Argentina. *Intensive Care Med.* 2010;36:1015-1022.
20. Gianella A, Walter A, Revollo R, Loayza R, Vargas J, Roca Y. Epidemiological analysis of the influenza A(H1N1)v outbreak in Bolivia, May-August 2009. *Euro Surveill.* 2009;14(35):1-4.
21. Schout D, Hajjar LA, Galas FR, Uip DE, Levin AS, Caiiffa Filho HH, et-al. Epidemiology of human infection with the novel virus influenza A (H1N1) in the Hospital das Clinicas, Sao Paulo, Brazil--June-September 2009. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64:1025-1030.
22. DGVS. Situación epidemiológica. *Boletín Semanal.* 2010;SE:1-8.
23. Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature.* 2008; 453:615-619.
24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5463-5467.