



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Seroprevalencia de la influenza A (H1N1) pandémica 2009  
en trabajadores del Instituto Mexicano del Seguro Social**

T E S I S  
QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA  
Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**  
P R E S E N T A  
IBT. LAURA ESTHER BALTIERRA JASSO

**Directores de Tesis:**

**Dra. Rosa María Ribas Jaimes**

**Dr. Juan Arturo Castelán Vega**



MÉXICO, D.F.

2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 1 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN para examinar la tesis titulada:

**Seroprevalencia de la influenza A (H1N1) pandémica 2009 en trabajadores del Instituto Mexicano del Seguro Social**

Presentada por la alumna:

**Baltierra**

Apellido paterno

**Jasso**

Apellido materno

**Laura Esther**

Nombre(s)

Con registro: 

A	1	0	0	1	4	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

#### Directores de tesis

Dra. Rosa María Ribas Jaimes

Dr. Juan Arturo Castelán Vega

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

Dra. Sandra Rivera Gutiérrez

Dra. Alicia Jiménez Alberto

Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

**Dr. Manuel Jesús Piñón López**



**E. P.**  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 2 del mes diciembre del año 2011 la que suscribe Laura Esther Baltierra Jasso alumna del Programa de Biomedicina y Biotecnología Molecular con número de registro A100143, adscrita a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es coautora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Rosa María Ribas Jaimes y del Dr. Juan Arturo Castelán Vega, y ceden únicamente los derechos del título y del resumen del trabajo intitulado Seroprevalencia de la influenza A (H1N1) pandémica 2009 en trabajadores del Instituto Mexicano del Seguro Social al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos.

El contenido textual, fotográfico, gráficas y datos del trabajo se someterán para su publicación, por lo que se reserva la información completa de esta tesis únicamente para la evaluación y consulta de los miembros del jurado académico del examen de maestría de Laura Esther Baltierra Jasso.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de los autores. Éste puede ser obtenido escribiendo a la Dra. Rosa María Ribas Jaimes a la siguiente dirección rmrj@encb.ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

Nombre y firma de la Alumna  
Laura Esther Baltierra Jasso

Nombre y firma de la Directora de Tesis  
Dra. Rosa María Ribas Jaimes

Nombre y firma del Director de Tesis  
Dr. Juan Arturo Castelán Vega



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Producción y Control de Biológicos del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), bajo la dirección de la Dra. Rosa María Ribas Jaimes y del Dr. Juan Arturo Castelán Vega.

Se realizó en colaboración con la Dra. Alicia Jiménez Alberto y la Dra. Iris Citlali Estrada García de la ENCB-IPN; la Dra. Guadalupe Aguilar Madrid y el Dr. Cuauhtémoc Arturo Juárez Pérez del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); la Dra. Carol Weiss y el Dr. Wei Wang del Centro de Evaluación e Investigación de Biológicos de la Agencia de Fármacos y Alimentos de los EE.UU. (FDA por sus siglas en inglés); y con el Dr. Vianney Ortiz Navarrete del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

El presente trabajo formó parte de los siguientes proyectos institucionales:

Efectos de mutaciones en la hemaglutinina del virus de la influenza A (H1N1) sobre el reconocimiento de receptores celulares y el evento de fusión membranal. **Registro SIP: 20101304.**

Búsqueda y optimización de inhibidores de la hemaglutinina del virus de la influenza. **Registro SIP: 20111227.**

Estudio de la biología molecular de metiltransferasas y de algunas enfermedades infecciosas o genéticas para la obtención de productos biotecnológicos. **Registro SIP 20113197.**

Además formó parte del trabajo global: Seroprevalencia durante la pandemia de influenza A (H1N1) en México, a través de los proyectos:

Eficacia de la vacuna estacional contra la influenza A (H1N1) 2009. **Registro: FON. INSTIT. 26/2009.**

Prevalencia de infección por el virus de la influenza A (H1N1), y el estudio de casos sospechosos en trabajadores del Instituto Mexicano del Seguro Social Enero – Mayo 2009. **Registro: SALUD-2009-C02-126774.**

La alumna fue becaria del:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de la convocatoria Febrero2010-Enero2012. **Número de becario: 238256.**
- Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional de los proyectos con registros **SIP: 20111227** y **SIP 20113197**

## AGRADECIMIENTOS

*Antes que todo me gustaría dedicar este trabajo a la memoria de mis abuelos quienes me han acompañado en todo este arduo camino y permanecen siempre en mis recuerdos. Muchas gracias por todas sus enseñanzas, amor y apoyo incondicional. También agradezco a mis papás Inés y Lauro y a mi hermano Gabriel, por ser el soporte de cada logro que he realizado. Soy afortunada de tenerlos a mi lado, sin su ánimo y firmeza no podría alcanzar todas las metas que he realizado hasta el momento. Mil gracias.*

*Por supuesto en este sendero he tenido la dicha de conocer grandes personas las cuales no sólo me acompañan, sino que me recuerdan lo importante que es compartir cada momento con los amigos. Gracias a mi hermano Ricardo, a todos mis queridos amigos y compañeros de UPIBI y del CINVESTAV, en especial a Rafa, Ilse, Beto, Braus y Charly; a mis maravillosas amigas Chío, Ari, Bere; a mis grandiosos amigos de antaño Adrian, Miguel, Ceci, Rebeca, Nadinne, Laura, Adriana, Alis y Betty. Gracias a mi gran amiga Lena por escucharme y no dejar que me rinda, en verdad tus palabras han sido un gran aliento, principalmente en los malos momentos que tristemente compartimos, pero nos recordaron lo importante que es levantarse y continuar. Todos ustedes cada día me enseñan que la verdadera amistad permanece inalterable, sin importar que transcurra el tiempo.*

*Indudablemente quiero agradecer a aquellas personas que compartieron directamente conmigo este gran paso. Gracias a la Dra. Rosa Ma. Ribas y al Dr. Juan A. Castelán por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos, por su guía, enseñanzas y grandes momentos. A la Dra. Alicia Jiménez por su instrucción y apoyo para el desarrollo del presente trabajo. La andanza por el laboratorio de Producción y Control de Biológicos me ha traído grandes satisfacciones, amistades y aprendizajes. Especialmente muchas gracias Jenny, Gloria, Elian y Fani, es reconfortante saber las invaluable amistad que logré en esta aventura. Muchas gracias chicas por alentarme y por los maravillosos días en el laboratorio de Producción, créanme que no lo olvidaré.*

*Igualmente quisiera agradecer a la Dra. Guadalupe Aguilar y al Dr. Cuauhtémoc Juárez por su tiempo y asesoría.*

*Mil gracias a todos.*

# CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Morfología y organización genética de los virus de influenza A.</i>	1
1.2. <i>Transmisión de los virus de influenza y sintomatología.</i>	3
1.3. <i>Ciclo de replicación del virus de influenza A.</i>	4
1.4. <i>Variación antigénica y reordenamiento genómico de los virus de influenza A.</i>	7
1.5. <i>Respuesta inmune contra los virus de influenza.</i>	8
1.6. <i>Pandemias de influenza: Retrospectiva histórica de las pandemias.</i>	10
1.6.1. <i>Pandemia por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.</i>	11
1.7. <i>Vacunación contra los virus de influenza.</i>	14
1.8. <i>Métodos de diagnóstico.</i>	15
1.9. <i>Pseudotipos retrovirales.</i>	16
1.10. <i>Estudios de seroprevalencia.</i>	19
1.11. <i>Justificación</i>	22
1.12. <i>Objetivo general.</i>	23
1.12.1. <i>Objetivos particulares.</i>	23
1.13. <i>Hipótesis.</i>	23
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>24</b>
2.1. <i>Plásmidos y líneas celulares.</i>	24
2.2. <i>Sueros</i>	24
2.3. <i>Obtención de los vectores de expresión para generar las proteínas que formaran a los pseudotipos retrovirales.</i>	26

2.3.1. Preparación de las células competentes de <i>E. coli</i> DH5α.	26
2.3.2. Transformación de las células competentes de <i>E. coli</i> DH5α.	26
2.3.3. Extracción y purificación del DNA plasmídico.	27
2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa.	28
2.3.5. Reacción de restricción enzimática de los plásmidos.	29
2.4. Obtención de pseudotipos retrovirales y su empleo en ensayos de microneutralización.	29
2.4.1. Producción de pseudotipos retrovirales.	29
2.4.2. Cuantificación de los pseudotipos retrovirales.	29
2.4.3. Ensayos de microneutralización de la HA viral.	30
2.4.3.1. Primera etapa: Selección de sueros.	30
2.4.3.2. Segunda etapa: Curvas de titulación de sueros separados en la primera etapa.	31
2.5. Análisis estadístico.	31
2.6. Análisis bioinformático.	32
2.6.1. Búsqueda de sustituciones de aminoácidos.	32
2.6.2. Evaluación de estabilidad: Dinámica molecular.	33
<b>3. RESULTADOS.</b>	34
I. Análisis de sueros de trabajadores.	34
II. Análisis bioinformático.	49
<b>4. DISCUSIÓN.</b>	57
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	63
<b>6. PROSPECTIVAS</b>	64
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	65
<b>URLs.</b>	73
<b>ANEXO I.</b>	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del virus de la influenza A (H1N1).	3
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de internalización del virus de la influenza A en las células hospederas.	4
<b>Figura 3.</b> Diagrama de la estructura de una subunidad del trímero HA a pH neutro y después de una incubación a pH de fusión (pH 5.0, 20°C).	5
<b>Figura 4.</b> Ciclo de replicación del virus de influenza A.	6
<b>Figura 5.</b> Sitios antigénicos presentes en la superficie del trímero de HA del virus de la influenza A.	9
<b>Figura 6.</b> Escena de una sala de atención a pacientes durante la pandemia de “gripe española”.	11
<b>Figura 7.</b> Segmentos, hospederos y año del reordenamiento de los genes presentes en el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.	12
<b>Figura 8.</b> Casos confirmados de influenza A(H1N1)pdm09 y número de defunciones por grupos de edad en México.	13
<b>Figura 9.</b> Distribución mundial del virus de la influenza.	14
<b>Figura 10.</b> Producción de pseudotipos retrovirales y su uso en ensayos de microneutralización.	18
<b>Figura 11.</b> Esquema de trabajo de la parte experimental I.	25
<b>Figura 12.</b> Esquema de trabajo de la parte experimental II.	26
<b>Figura 13.</b> Mapeo de restricción de los plásmidos pMLV, pHAT y pGal.	35
<b>Figura 14.</b> Mapeo de restricción de los plásmidos pCaNA, pM2 y pCaCo.	36
<b>Figura 15.</b> Cuantificación de pseudotipos cosechados a las 48, 72 y 96 h post-transfección.	37
<b>Figura 16.</b> Curva de neutralización de suero problema para el cálculo del título de NAbs.	46
<b>Figura 17.</b> Posiciones de las mutaciones predichas en las estructuras de la HA 3M6S y 3LZG.	49

<b>Figura 18.</b> Ejemplo de la selección de mutaciones capaces de formar nuevas interacciones.	50
<b>Figura 19.</b> Gráficas del RMSD por residuo a 600 K.	51
<b>Figura 20.</b> Evolución de las estructuras secundarias a 600 K.	51
<b>Figura 21.</b> Gráficas del RMSD global de las simulaciones realizadas.	53
<b>Figura 22.</b> Gráficas del RMSD por residuo a 300 K.	53
<b>Figura 23.</b> Evolución de las estructuras secundarias a 300 K.	54
<b>Figura 24.</b> Estructuras de la HA silvestre y mutada coloreadas con base en los valores del RMSD por residuo.	55
<b>Figura 25.</b> Gráfica del RMSD por residuo de las estructuras a 400 K.	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Segmentos del genoma del virus de influenza A y proteínas codificadas a partir de cada uno de estos.	3
<b>Tabla 2.</b> Estudios de seroprevalencia de la influenza A(H1N1)pdm09 enfocados a trabajadores de la salud.	21
<b>Tabla 3.</b> Concentración y pureza de los plásmidos recuperados para la producción de pseudotipos retrovirales.	34
<b>Tabla 4.</b> Enzimas de restricción seleccionadas y el tamaño de los fragmentos esperados.	35
<b>Tabla 5.</b> Comparación de proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por sexo, edad y centro de trabajo.	38
<b>Tabla 6.</b> Análisis del riesgo de los trabajadores para seroconvertir contra la influenza A(H1N1)pdm09, asociado a centro de trabajo.	39
<b>Tabla 7.</b> Comparación de proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por puesto de trabajo, turno y transporte utilizado.	40
<b>Tabla 8.</b> Comparación de proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por contacto con posibles personas infectadas.	41
<b>Tabla 9.</b> Comparación de proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 con base en las medidas de protección reportadas.	43
<b>Tabla 10.</b> Análisis del riesgo de los trabajadores para seroconvertir contra la influenza A(H1N1)pdm09, asociado a número de contactos con influenza y uso de antivirales.	44
<b>Tabla 11.</b> Resultados de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 obtenidos comparando presencia de síntomas, adquisición o confirmación de influenza.	45
<b>Tabla 12.</b> Comparación de títulos de NAbs (GTMs) contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 obtenidos por edad, centro de trabajo, puesto y turno	47
<b>Tabla 13.</b> Comparación de títulos de NAbs obtenidos por contacto con posibles personas infectadas y formas de protección utilizadas por el trabajador para evitar el contagio con influenza A(H1N1)pdm09.	48
<b>Tabla 14.</b> Valores del RMSD de la HA silvestre y mutada a 300, 400 y 600 K.	52

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
A(H1N1)pdm09	A (H1N1) pandémico 2009
ED <sub>50</sub>	Concentración efectiva al 50%, en este caso dilución de suero al cual se obtiene el 50% de neutralización
HA	Hemaglutinina
HI	Inhibición de la hemaglutinación
IC	Intervalo de confianza
M1	Proteína de matriz
M2	Proteína formadora de canales de iones
MN	Microneutralización
NA	Neuraminidasa
NAbs	Anticuerpos neutralizantes
NEP/NS2	Proteína de exportación nuclear
NP	Proteína de la nucleocápside
NS1	Proteína antagónica de interferón
PA	Subunidad ácida de la RNA polimerasa
PB1(PB1-F2)/PB2	Subunidades básicas de la RNA polimerasa
pCaCo	Plásmido que contiene el gen de la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09
pCaM2	Plásmido que contiene el gen de la proteína M2 del virus de la influenza A(H1N1)pdm09
pCaNA	Plásmido que contiene el gen de la NA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09
pGal	Plásmido que contiene el gen que codifica a la enzima $\beta$ -galactosidasa
pHAT	Plásmido que contiene el gen que codifica a una proteasa presente en las vías aéreas humanas
pMLV	Plásmido que contiene al gen que codifica a la poliproteína Gag-Pol del MLV
RDRP	RNA polimerasa dependiente de RNA
RMSD	Desviación cuadrática de la media
RNP	Complejo ribonucleoproteico

## RESUMEN

Los virus de la influenza tipo A fueron responsables de las pandemias que surgieron en los años 1918, 1957 y 1968; y de la primera pandemia del siglo XXI en 2009. Los anticuerpos anti-hemaglutinina (HA) son capaces de bloquear la entrada viral y así prevenir la infección; estos anticuerpos neutralizantes (NAbs) se pueden detectar mediante ensayos de microneutralización (MN). Existen pocos reportes publicados acerca de la seroprevalencia de la influenza A(H1N1)pdm09 en trabajadores de la salud, a pesar de que son un grupo estratégico en el sistema de atención sanitaria. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar la seroprevalencia en trabajadores del IMSS previo a la campaña de vacunación contra la influenza A(H1N1)pdm09, realizando ensayos de MN con pseudotipos retrovirales portadores de la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09. Estos vectores retrovirales transfieren un gen reportero a células cuyos receptores son reconocidos por la HA, como consecuencia, los anticuerpos capaces de neutralizar la función de dicha proteína evitan a su vez la expresión del gen reportero. Adicionalmente, debido a la baja estabilidad que posee la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 que afecta su aplicación biotecnológica, se buscaron sustituciones que aumenten su estabilidad, realizando estudios bioinformáticos que incluyeron simulación de dinámica molecular de la HA silvestre y mutada con el fin de evaluar estructuralmente el efecto dichas sustituciones. Se encontraron siete mutaciones en el tallo de la HA del virus pandémico que aumentan la estabilidad de la proteína sin impactar en la antigenicidad. De acuerdo a los resultados obtenidos de seroprevalencia en los trabajadores del IMSS, ésta no fue significativamente mayor que en la población en general (26.71% vs 20%,  $p=0.872$ ). Al realizar un análisis más detallado de factores que favorecieron la seroconversión en el grupo de estudio, se encontró que el centro de trabajo ( $p<0.001$ ), número de casos con influenza pandémica con los que estuvo en contacto el trabajador ( $p<0.031$ ) y uso de antivirales ( $p<0.011$ ), estuvieron relacionados con un aumento en el riesgo del trabajador a seroconvertir. Sin embargo, ninguna de las variables estudiadas contribuyó al potenciar el título de NAbs contra la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09. Este trabajo presentó un indicio sobre de la diseminación del virus dentro de los hospitales del IMSS, las medidas de protección empleadas durante la pandemia y la situación de la seroprevalencia previo a la campaña de vacunación contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09. Es importante recordar que la identificación de los factores de riesgo asociados a seroconversión será de gran utilidad para que el IMSS pueda implementar estrategias de salud en el trabajo, que disminuyan los riesgos de adquirir infecciones como la influenza en escenarios de tipo epidémico o pandémico.

## ABSTRACT

Influenza viruses type A were responsible for pandemics in 1918, 1957, 1968, and for the first pandemic of the 21<sup>st</sup> century in 2009. Anti-HA antibodies are able to block the viral entry and prevent infection; these neutralizing antibodies (NAbs) can be detected by microneutralization assays (MN). Few reports had been published about the seroprevalence of influenza A(H1N1)pdm09 in healthcare workers, although they are a strategic group in the health care system. Therefore, the aim of this study was to analyze the seroprevalence among healthworkers from the IMSS, before the vaccination campaign against pandemic influenza of 2009, by MN assays using retroviral pseudotypes carrying the HA from the influenza virus A(H1N1)pdm09. These retroviral vectors transfer a reporter gene to cells whose receptors are recognized by the HA, as a result, antibodies capable to neutralize the function of this protein, prevent the expression of the reporter gene. Additionally, due the low stability which has the HA from the influenza virus A(H1N1)pdm09 affecting its biotechnological applications, we looked for substitutions sought to increase its stability, performing bioinformatic studies involving molecular dynamics simulation of wild-type and mutated HA to evaluate structurally the effect of such substitutions. We found seven mutations in the stem of the pandemic virus HA that increase the stability of the protein without impacting its antigenicity. According to the results, the seroprevalence in the healthworkers (IMSS) was not significantly higher than in general population (26.71% vs 20%,  $p = 0.872$ ). When we made a more detailed analysis of the factors that favored seroconversion in the group of study, we found that the workplace ( $p < 0.001$ ), number of cases of pandemic influenza that the worker was in contact ( $p < 0.031$ ) and use of an antivirals ( $p < 0.011$ ), were associated with an increased risk of the worker to seroconvert. However, none of these variables contributed to enhance the titer of NAbs against the HA of the influenza virus A(H1N1)pdm09. This work presents an indication of the spread of the virus in hospitals of the IMSS, the protection used during the pandemic and the status of the seroprevalence before the vaccination campaign against the influenza virus A(H1N1)pdm09. It is important to notice that the identification of risk factors associated with seroconversion will be useful for the IMSS to implement health strategies at work, for decreasing the risk to acquire infections such as influenza type scenarios epidemic or pandemic.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La influenza es una enfermedad respiratoria que puede ser causada por virus de la influenza de los tipos A, B y C. Se han observado epidemias causadas por tipos A y B, pero sólo los virus del tipo A tienen potencial pandémico (Klenk *et al.*, 2011), produciendo la mayoría de las pandemias de enfermedades respiratorias durante el siglo XX (Schmitt & Lamb, 2005) y la más reciente pandemia de influenza en 2009 (Hensley, 2009).

### 1.1. *Morfología y organización genética de los virus de Influenza A.*

Los virus de la influenza A son miembros de la familia *Orthomyxoviridae*, que contiene los géneros: *Virus de la influenza A*, *Virus de la influenza B*, *Virus de la influenza C*, *Isavirus* y *Virus tipo Thogoto* (Yassine *et al.*, 2010). Los virus de la influenza A son virus envueltos, tienen forma pleomórfica y miden de 80 a 120 nm de diámetro. Poseen un genoma de RNA de cadena negativa sencilla, que está dividido en 8 segmentos (Nayak *et al.*, 2009).

La envoltura lipídica, es una bicapa derivada de la membrana plasmática de la célula hospedera en donde el virus se replica y ensambla; la liberación se lleva a cabo mediante gemación (Brammer *et al.*, 2008). Insertadas en la envoltura del virión se encuentran las glicoproteínas virales hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) (Nayak *et al.*, 2009) y pequeñas cantidades de una proteína formadora de canales de iones (protón selectiva), llamada M2 (Schmitt & Lamb, 2005).

Los virus de influenza A se dividen en subtipos basados en las proteínas de superficie HA y NA. Se conocen 16 tipos de HA y nueve tipos de NA (Brammer *et al.*, 2008). La subtipificación de los virus se basa en las propiedades antigénicas de las dos glicoproteínas, determinadas a partir de reacciones con sueros hiperinmunes anti-HA y anti-NA; pero los análisis de las secuencias de los genes que codifican para cada una ha reforzado esta clasificación (Russell *et al.*, 2004).

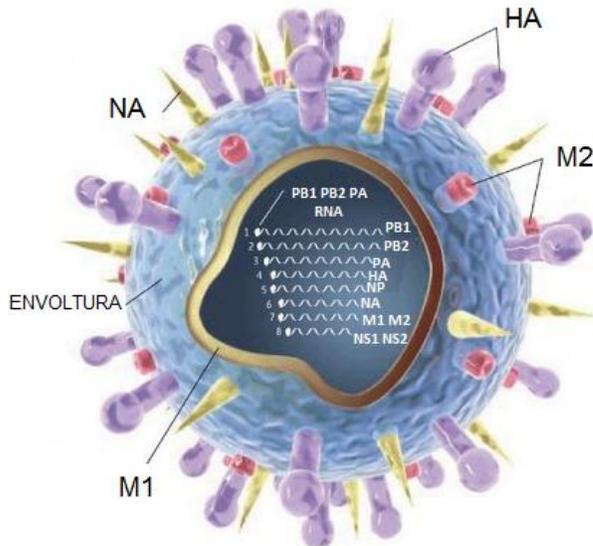
La proteína de matriz M1 interactúa con HA, NA y M2, además con la proteína de exportación nuclear (NEP, también llamada proteína no estructural NS2) y con un complejo ribonucleoproteico (RNP) (Bouvier & Palese, 2008) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Segmentos del genoma del virus de influenza A y proteínas codificadas a partir de cada uno de estos.

Segmento	Tamaño del segmento (nt)	Proteína Codificada	Tamaño de la proteína (aa)	Función de la Proteína
1	2341	PB2	759	Subunidad de la polimerasa; reconocimiento de CAP del mRNA
2	2341	PB1	757	Subunidad de la polimerasa; extensión de RNA, actividad de endonucleasa.
		PB1-F2	87	Actividad pro-apoptótica
3	2233	PA	716	Subunidad de la polimerasa; actividad de proteasa
4	1778	HA	550	Glicoproteína de superficie; antígeno principal, unión a receptor y actividad de fusión
5	1565	NP	498	Proteína de unión a RNA; regulación de entrada a núcleo
6	1413	NA	454	Glicoproteína de superficie; actividad de sialidasa, liberación del virus
7	1027	M1	252	Proteína de matriz; interacción con vRNP, regulación de exporte de RNA del núcleo, ensamblaje del virión.
		M2	97	Canal iónico; desnudamiento y ensamblaje
8	890	NS1	230	Proteína antagónica de interferón; regulación de la expresión de los genes del huésped
		NEP/NS2	121	Exportación del RNA desde el núcleo

El tamaño de los segmentos está basado en el genoma del virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Las proteínas PB2, PA, HA, NP y NA se codifican en diferentes segmentos de RNA. M2 y NEP son expresadas a partir de cortes alternativos del mRNA, mientras que PB1-F2 se codifica en un marco de lectura alternativo (Bouvier & Palese, 2008).

Los RNP consisten de subunidades repetidas de la proteína de nucleocápside NP en una configuración helicoidal cubriendo al RNA, evitando así su degradación por RNasas (Nayak *et al.*, 2009) (Figura 1).



**Figura 1. Estructura del virus de la influenza A (H1N1).** Modelo de la distribución de las proteínas del virus de influenza A (Kaiser, 2006).

Asociada a los RNP está el complejo RNA polimerasa-dependiente de RNA (RDRP), que transcribe el genoma viral a RNA mensajero (mRNA). El complejo RDRP consiste de tres subunidades: PB1, PB2 (subunidades básicas de la polimerasa) y PA (subunidad ácida de la polimerasa), que están presentes de 30 a 60 copias por virión. RDRP lleva a cabo varios procesos como son la unión a las estructuras CAP que son secuestradas de los mRNA celulares, el corte endonucleolítico, la síntesis de RNA y la poliadenilación (Schmitt & Lamb, 2005).

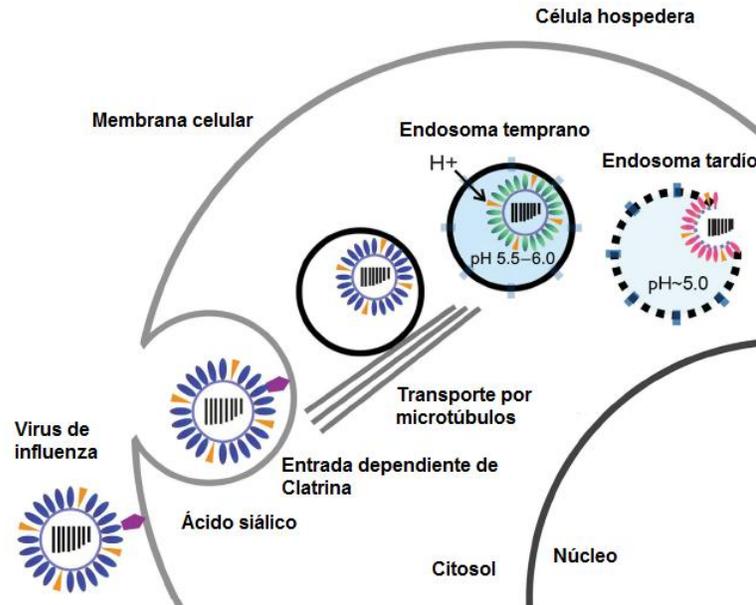
### 1.2. Transmisión de los virus de influenza y sintomatología.

Los virus de la influenza se diseminan de célula a célula y de huésped a huésped, en forma de partículas infecciosas que se ensamblan y liberan de las células infectadas (Nayak *et al.*, 2009). La transmisión de estos virus es por aerosoles; la replicación ocurre en el epitelio del tracto respiratorio y normalmente alcanza un máximo 2-3 días después de la infección. El periodo de liberación de viriones es de 5-7 días, y puede durar en niños hasta 2 meses. Después de la incubación de 1-5 días, los pacientes presentan síntomas como: fiebre, dolor de garganta, fatiga, dolor de cabeza y muscular. Los casos severos evolucionan a neumonía primaria causada por el mismo virus o a neumonía viral-bacteriana (Klenk *et al.*, 2011).

### 1.3. Ciclo de replicación del virus de influenza A.

La unión de los virus de influenza a los receptores celulares es mediada por la glicoproteína HA, la cual es la proteína mayoritaria de la envoltura (aproximadamente 80%); HA forma un trímero que contiene sitios de unión al receptor y epítopos para anticuerpos neutralizantes (NABs) (Nayak *et al.*, 2009). HA se une a los residuos de ácido siálico terminales de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular que actúan como receptores. Las partículas virales son internalizadas por endocitosis, seguida de fusión de membranas (Schmitt & Lamb, 2005).

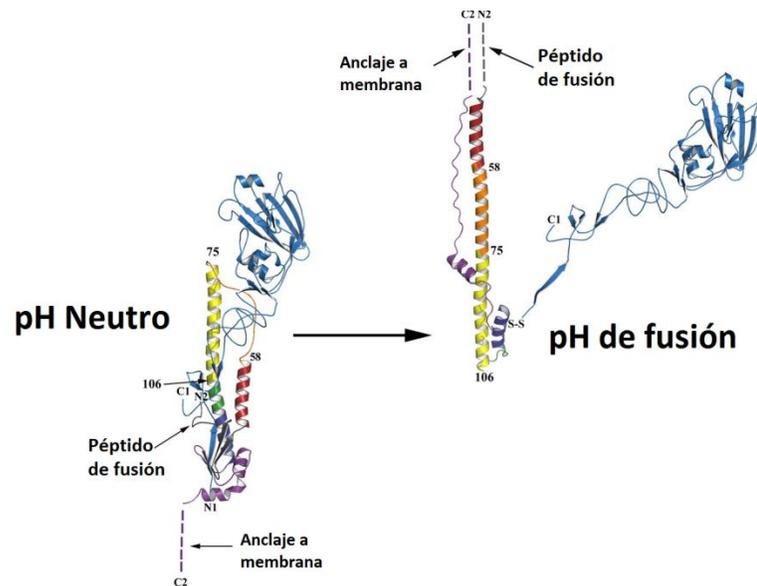
La fusión de la envoltura viral con la membrana celular es mediada por la interacción de HA con su receptor, y está acoplada al cambio conformacional esta proteína en el ambiente ácido del endosoma (Figura 2) (Lee, 2010).



**Figura 2. Mecanismo de internalización del virus de la influenza A en las células hospederas.** La maduración del endosoma expone al virus a etapas de acidificación. La fusión de las membranas del virus y el endosoma ocurre rápidamente a pH 5; sin embargo, estudios han mostrado que la proteína de fusión HA se vuelve activa a pH 5.5-6 para iniciar el proceso que finalmente lleva a la fusión de membranas (Lee, 2010).

El procesamiento de la HA es crítico para la infectividad viral. La HA del virus se expresa como un precursor llamado HA0, éste es cortado por proteasas del huésped en dos subunidades (HA1 y HA2) que se mantienen unidas por puentes disulfuro. HA1 contiene el sitio de unión al receptor, mientras que HA2 lleva a cabo la fusión de membranas (Lee, 2010).

A medida que el pH endosomal disminuye, se genera un cambio conformacional de HA por la protonación de ciertos residuos de aminoácidos, principalmente histidinas. Este cambio expone el péptido de fusión activo (HA2), el cual es capaz de atraer a las dos membranas y provocar la fusión de la bicapa (Weissenhorn *et al.*, 2007) (Figura 3).

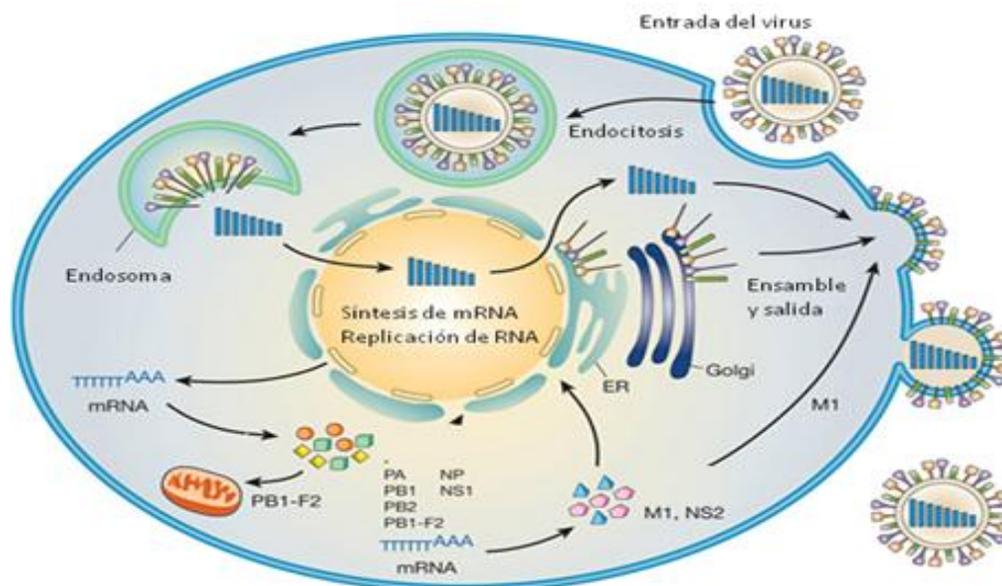


**Figura 3. Diagrama de la estructura de una subunidad del trímero HA a pH neutro y después de una incubación a pH de fusión (pH 5.0, 20°C).** Las cadenas polipeptídicas HA1 y HA2 están unidas por un puente disulfuro; se muestran de color azul y multicolor, respectivamente. La comparación de los diagramas muestra que a pH de fusión los dominios alejados de la membrana se separan. El péptido de fusión en el extremo N-terminal de HA2 (gris) se relocaliza, como consecuencia del cambio de conformación, la región C-terminal de HA2 (morado) se reorienta y repliega formando una estructura antiparalela, posicionando el anclaje a membrana C-terminal en el mismo extremo junto con el péptido de fusión (Russell *et al.*, 2008).

Cuando las capas externas de las membranas interaccionan, los fosfolípidos de forma cónica provocan una curvatura espontánea, desestabilizando la bicapa; al mismo tiempo induce la formación de partículas lipídicas y con ello se promueve la hemifusión de las membranas (Weissenhorn *et al.*, 2007).

M2 funciona como un canal iónico, participando en la fase temprana de la infección y dirigiendo la pérdida de la envoltura que conlleva a la liberación de RNP de la proteína M1 (Russell *et al.*, 2008).

Una vez liberados, los complejos RNP son transportados al núcleo de la célula hospedera, donde se sintetizan los mRNA<sup>1</sup> para la traducción de las proteínas virales y el RNA viral segmentado que conformará el genoma de la progenie viral. Los componentes de las partículas virales se organizan y concentran en la membrana celular. La acumulación de la proteína M1 del lado citoplásmico de la membrana inicia el proceso de gemación. Se reclutan complejos de RNPs conteniendo ocho segmentos de RNA viral en los sitios de ensamblaje, y se liberan las partículas por fisión con la membrana. Las proteínas HA continúan uniendo al virión al ácido siálico presente en la superficie de la membrana celular hasta que la NA, con su actividad de sialidasa, corta los residuos del ácido siálico terminal para liberar la progenie viral (Arias *et al.*, 2009) (Figura 4).



**Figura 4. Ciclo de replicación del virus de influenza A.** Después de la endocitosis los complejos RNP son liberados al citoplasma y son transportados al núcleo donde la replicación y la transcripción tienen lugar. Los mRNA son exportados al citoplasma para su traducción. Las proteínas tempranas, requeridas para la replicación y transcripción, son transportadas al núcleo. Posteriormente, las proteínas M1 y NS2 facilitan la exportación de las RNPs sintetizadas. El ensamblaje y gemación de la progenie viral ocurre en el citoplasma (Arias *et al.*, 2009).

<sup>1</sup> Estos mRNA tienen tanto estructura CAP, como cola de poli A conformada por una secuencia de siete uracilos consecutivos (Arias, 2009).

#### 1.4. Variación antigénica y reordenamiento genómico de los virus de influenza A.

La constante evolución de los virus de influenza A se lleva a cabo por dos mecanismos principales: la acumulación de mutaciones puntuales introducidas por errores de la RNA polimerasa viral y el reordenamiento de los genes entre dos cepas de diferentes linajes. La variabilidad antigénica de los virus de influenza es la base del surgimiento de epidemias. La tasa de mutación durante la replicación del genoma de los virus de influenza es de un nucleótido por cada copia del genoma ( $7.3 \times 10^{-5}$  mutaciones/nucleótido replicado) (Arias *et al.*, 2009).

Los cambios antigénicos reflejan la presión selectiva generada por la respuesta inmune del hospedero; las variaciones mayores se observan en las proteínas que son blanco de los NAb. Por ello, las proteínas de superficie de los virus son altamente variables, aunque son capaces de seguir llevando funciones primordiales para la infección a pesar de las mutaciones acumuladas (Gallaher, 2009).

El segundo mecanismo se produce debido a la naturaleza segmentada del genoma del virus de influenza. Estos virus son capaces de redistribuir su genoma cuando la misma célula es infectada por más de un virus. Este reordenamiento se produce cuando interactúan virus de diferentes linajes, dando origen a genotipos híbridos que contienen segmentos derivados de una cepa, mientras que otros segmentos son derivados de la segunda (Garten *et al.*, 2009).

Los cerdos se han considerado los reservorios adecuados para la asociación de los virus de la influenza de diferentes linajes. Anteriormente se describió que su tracto respiratorio contiene, en igual proporción, tanto receptores N-acetilneuramínico  $\alpha 2,3$ -galactosa (preferentemente para virus aviares), como ácido N-acetilneuramínico  $\alpha 2,6$ -galactosa, (principal receptor en mamíferos) (Skehel & Wiley, 2000; Klenk *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que en los cerdos existe una distribución variable en la parte baja del tracto respiratorio, mientras que en la tráquea se encuentran abundantemente receptores  $\alpha 2,6$ -galactosa; lo anterior es similar a la distribución en humanos (Nelli *et al.*, 2010; Van Poucke *et al.*, 2010; Trebbien *et al.*, 2011).

### 1.5. Respuesta inmune contra los virus de Influenza.

La respuesta innata limita la replicación viral en los primeros días de infección. El primer blanco para el virus de influenza son las células epiteliales del tracto respiratorio, donde los macrófagos son los principales encargados de la respuesta inicial (Hensley, 2009). La infección por virus de influenza, como en otros virus, está caracterizada por una alta producción de citocinas pro-inflamatorias como el interferón (IFN) tipo I y II, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $\alpha$ -TNF), interleucinas 6 (IL-6), 8 (IL-8); y quimiocinas como IP-10 (proteína-10 inducible de interferón  $\gamma$ ), RANTES (quimiocina ligando-5) y MIG (monocina inducida por interferón  $\gamma$ ). El efecto antiviral limita la replicación viral mediante la inhibición de síntesis de proteínas (Chan *et al.*, 2005; Kreijtz *et al.*, 2011). La activación de la cascada de quimiocinas resulta en una acumulación de neutrófilos en el pulmón y su subsecuente desgranulación (Cheung *et al.*, 2002; Tate *et al.*, 2011).

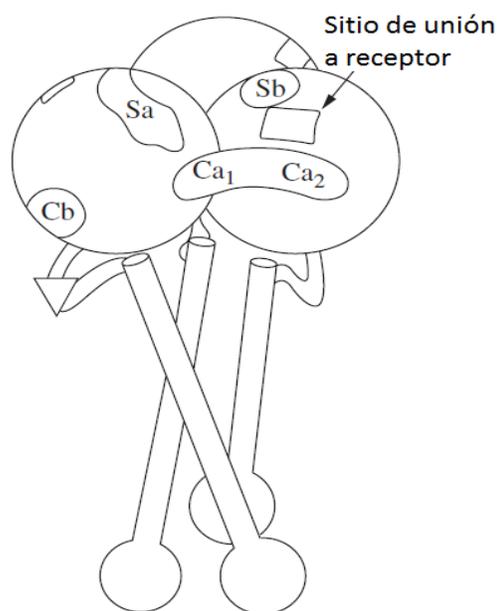
Durante el proceso de eliminación de células epiteliales infectadas participan linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, las cuales aparecen en el pulmón 4 días post-infección (Brincks *et al.*, 2008). Las inmunoglobulinas (Ig) M y A proporcionan una defensa durante la fase inicial de la infección, pero una vez establecida la enfermedad comienza la secreción de IgGs. Cuando se presenta una segunda infección, los linfocitos T<sub>h</sub> cooperadoras, específicas contra la cepa viral, activan los linfocitos B de memoria, resultando en una alta producción de anticuerpos (Combadière *et al.*, 2010).

La infección por los virus de influenza induce una respuesta específica al virus. Especialmente las células B maduras que secretan anticuerpos contra las glicoproteínas HA y NA son la más importante protección contra infecciones futuras (Nayak *et al.*, 2010; Kreijtz *et al.*, 2011). Los anti-NA evitan la liberación del virus de la célula hospedera y así limitan su transmisión. Los anti-HA bloquean la entrada a la célula ya que impiden la unión del virus al receptor o la fusión con la membrana celular (Hensley, 2009). Sin embargo, los anticuerpos anti-NA no neutralizan directamente al virus, por lo que se considera a la HA como el determinante antigénico más importante para la neutralización del virus mediada por anticuerpos durante una infección natural o por inmunización inducida (Temperton *et al.*, 2007; Kreijtz *et al.*, 2011).

La estructura cristalográfica de la HA muestra dos regiones estructurales distintivas: un tallo que comprende tres  $\alpha$ -hélices súper-enrolladas, y una cabeza globular con un núcleo de plegamientos  $\beta$  posicionado en la parte superior del tallo (Figura 5) (Knossow & Skehel, 2006). La cabeza contiene el sitio de unión a ácido siálico, que está rodeado de determinantes antigénicos designados como Sa, Sb, Ca1, Ca2 y Cb. La porción HA1, además de contener al sitio de unión al receptor, abarca los sitios antigénicos (Hensley, 2009).

La reducción de la afinidad de los anticuerpos es consecuencia de sustituciones en los determinantes antigénicos mencionados anteriormente; así el virus es capaz de evadir el sistema inmune sin importar que el individuo tenga inmunidad pre-existente contra otros virus de influenza (Brownlee & Fodor, 2001; Nayak *et al.*, 2010). A pesar de los frecuentes cambios en los aminoácidos para evadir a los NAbs, el arreglo tallo-cabeza se conserva entre las cepas y subtipos (Bouvier & Palese, 2008).

Como se mencionó anteriormente, los subtipos de HA fueron definidos con base en las propiedades antigénicas. Entre subtipos, como por ejemplo H3, la secuencia de aminoácidos de las HAs varía por encima de un 20%; mientras que entre subtipos las secuencias mantienen regiones idénticas de entre 30 a 70%. Los dominios de HA1 son más variables que los de HA2, lo cual es consistente con las propiedades antigénicas (Skehel & Wiley, 2000). Filogenéticamente se han formado dos grupos de HAs: el grupo 1 contiene H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16; y el grupo 2 contiene H3, H4, H7, H10, H14 y H15. Los análisis de estructuras tridimensionales han correlacionado estas subdivisiones. (Russell *et al.*, 2004; Gamblin & Skehel, 2010).



H1

**Figura 5. Sitios antigénicos presentes en la superficie del trímero de HA del virus de la influenza A.** Localización aproximada de los sitios antigénicos Cb, Sa, Sb y Ca en la cabeza globular de H1 del virus A/PR/8/34. Los sitios antigénicos están presentes en cada monómero, pero sólo se muestran en un monómero para simplificar (Brownlee & Fodor, 2001).

Los NABs con alta actividad neutralizante son específicos al dominio formado por los bucles de la cadena HA1 en la parte superior de HA. La mayoría de los anti-HA neutralizan la unión de HA al ácido siálico del receptor celular. Un conjunto de éstos inhiben la fusión del virus uniéndose a HA2 o a la región próxima de HA1 (Yang *et al.*, 2010).

#### *1.6. Pandemias de Influenza: Retrospectiva histórica de las pandemias.*

El término pandemia de influenza se refiere a la ocurrencia masiva de casos, ocasionada por la aparición de un nuevo subtipo de virus A (Kuri-Morales *et al.*, 2006). Dos condiciones deben satisfacerse para que un brote de influenza se pueda clasificar como una pandemia: El primero es que el brote de la infección, surgido en un área geográfica específica, se esparza alrededor del mundo; el segundo, que el nuevo virus pandémico de tipo A tenga una HA no relacionada a virus de influenza circulantes anteriormente, además de que sea capaz de generar fácilmente más virus con la HA no relacionada (Ryan, 2009).

En 1932, se aisló por primera vez un virus de influenza en el laboratorio, a partir de esto la historia de las infecciones por influenza se ha ido recopilando y confirmando por medio del diagnóstico en laboratorios (Brammer *et al.*, 2008). El primer brote documentado que encaja en la descripción de una pandemia ocurrió en 1580, originada en Asia y diseminada a través de Europa, África y América. Posteriormente, se reportaron 31 epidemias de influenza en cuatro décadas (Ryan, 2009). Durante el siglo XX, las pandemias ocurrieron en 1918 (tipo A H1N1), 1957 (tipo A H2N2), 1968 (tipo A H3N2) (Brammer *et al.*, 2008) y la primera del siglo XXI en el 2009 (tipo A H1N1) (Hensley, 2009) (Figura 6).

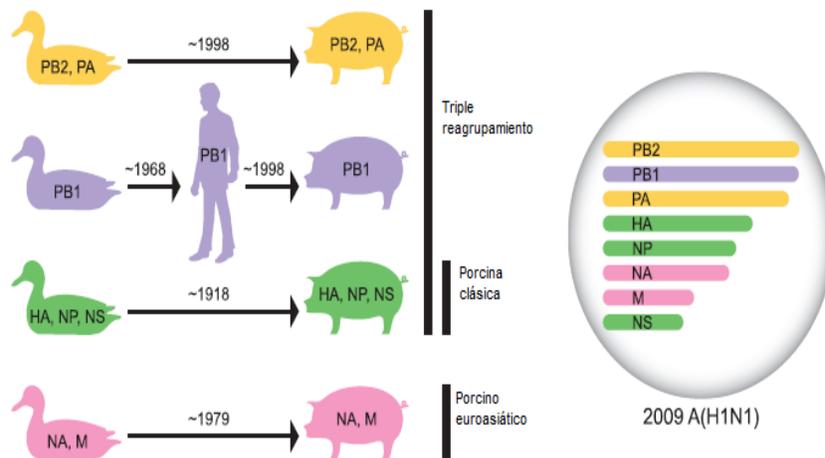


**Figura 6. Escena una sala de atención a pacientes durante la pandemia de “gripe española”.** Enfermeras voluntarias de la Cruz Roja atendiendo a pacientes con influenza en el Auditorio de Oakland, EE.UU., usado como hospital durante la pandemia de 1918 (Ryan, 2009).

#### *1.6.1. Pandemia por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.*

A finales de marzo del 2009, dos niños del sur de California en EE.UU., presentaron síntomas parecidos a influenza y, posteriormente, se reportaron casos similares en México (Neumann & Kawaoka, 2011). Para principios de abril del 2009 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) alertó de casos atípicos de infecciones respiratorias que continuaban fuera de la temporada de influenza estacional; además se presentaron tres brotes en Veracruz, Tlaxcala y San Luis Potosí de marzo a abril de ese año. Estos eventos, junto con el reporte de un caso sospechoso de neumonía atípica en el estado de Oaxaca el 13 de abril, dispararon la alerta epidemiológica el 17 de ese mes y se intensificó la vigilancia de las infecciones respiratorias agudas. El 23 de abril, el gobierno mexicano anunció la identificación de una cepa nueva de virus de influenza A(H1N1) en Oaxaca y Veracruz (Echevarría-Zuno *et al.*, 2009). La nueva cepa de influenza A(H1N1) se diseminó globalmente, a tal velocidad que para el 11 de junio del 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) decretó la alerta sanitaria nivel 6, lo que oficialmente designó esta epidemia como una pandemia (Hensley, 2009).

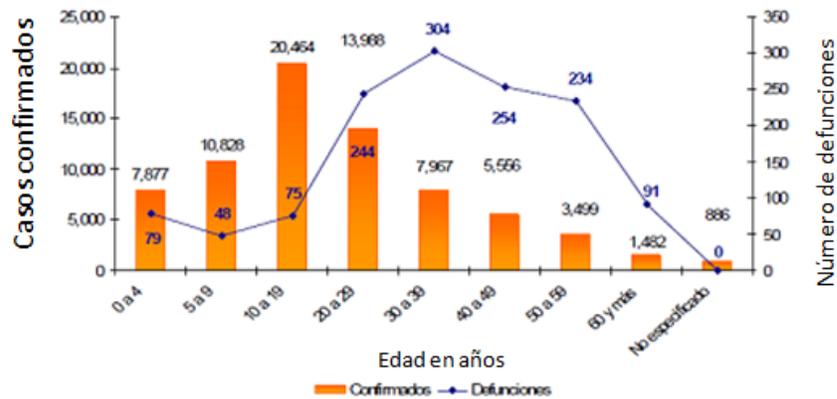
El mapa genético del virus de la influenza A (H1N1) pandémico 2009 (A(H1N1)pdm09, nomenclatura estandarizada por la OMS el 18 de octubre del 2011, URL<sup>4</sup>) contiene una combinación genes de diferentes linajes que previamente no se habían reportado en cerdos o humanos (Garten *et al.*, 2009) (Figura 7).



**Figura 7. Segmentos, hospederos y año del reordenamiento de los genes presentes en el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.** Origen de los segmentos del genoma del virus de la influenza A(H1N1)pdm09: PB2 y PB1, subunidades básicas de la RNA polimerasa; PA, subunidad ácida de la RNA polimerasa; HA, hemaglutinina; NP, nucleoproteína; NA, neuraminidasa; M, matriz; NS no estructural. El color del segmento muestra el hospedero (Garten *et al.*, 2009).

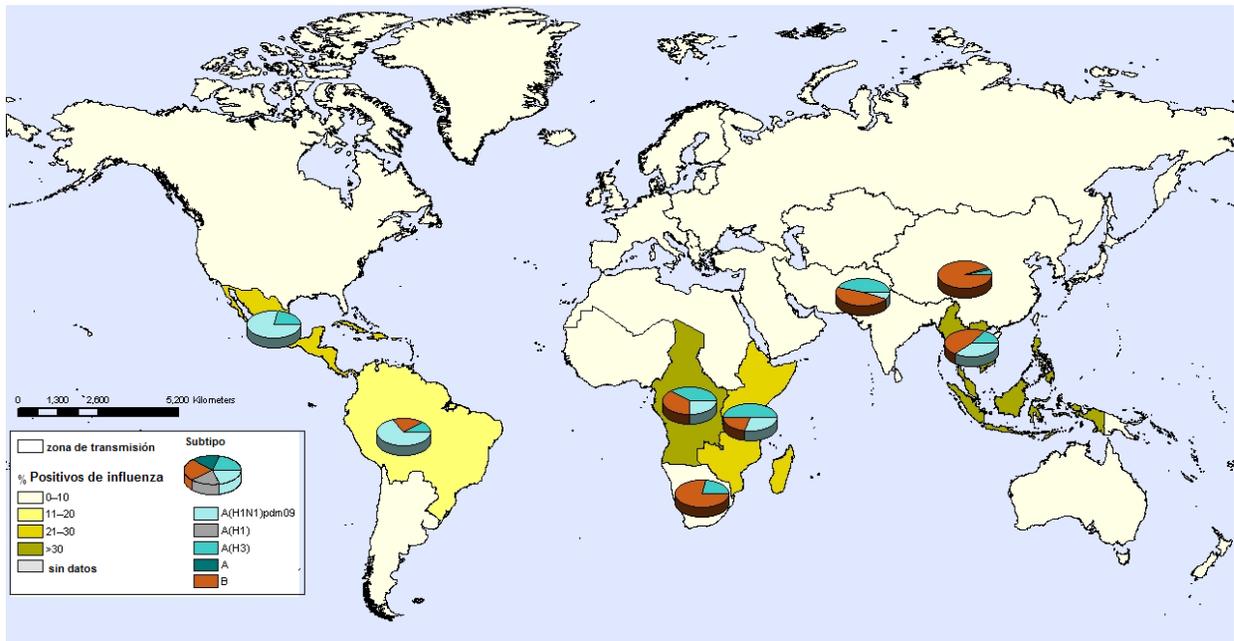
Los segmentos de NA y M provienen del linaje de cerdo euroasiático. Estos segmentos se derivaron originalmente de virus de influenza aviar y se cree que se introdujeron a la población porcina euroasiática en 1979. Los genes de HA, NP y NS son del linaje clásico de cerdo, que circula desde 1918 y se encuentran también en los virus con triple reordenamiento. PB2 y PA son segmentos de un linaje de cerdo con triple reordenamiento, provenientes de un virus aviar que entró a los cerdos en 1998, en Norteamérica. Finalmente el segmento PB1 también proviene de un virus de triple reordenamiento, tiene un origen humano (Norteamérica) y fue adquirido de aves alrededor del año 1968 (Garten, 2009).

Datos de la OMS señalan que hasta el 12 de julio del 2010, alrededor del mundo, más de 214 países reportaron casos confirmados de influenza A(H1N1)pdm09, incluyendo más de 18337 muertes. Tan solo en México, en el último reporte emitido por la Secretaría de Salud del 19 de julio del 2010, se confirmaron 72548 casos de influenza A(H1N1)pdm09 y 1316 defunciones (URL<sup>6</sup>) (Figura 8).



**Figura 8. Casos confirmados de influenza A(H1N1)pdm09 y número de defunciones por grupos de edad en México.** Distribución de las defunciones y de los casos confirmados de infección por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09, presentados por grupo de edad en México hasta el último reporte emitido el 19 de julio de 2010 (72548 casos confirmados y 1316 defunciones). Tomado de la página oficial de la Secretaría de Salud (URL<sup>6</sup>).

El 10 de agosto del 2010, la directora general de la OMS anunció el inicio del periodo de post-pandemia. Esta etapa indica que la actividad del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 ha disminuido a niveles habituales de una influenza estacional. Por el momento permanece baja o indetectable la transmisión de la influenza A(H1N1)pdm09; pero en algunos países se han reportado casos confirmados (Nicaragua, Camerún, Camboya y la República Democrática de Laos), hasta la semana del 13 al 19 de noviembre del 2011 (URL<sup>5</sup>) (Figura 9).



**Figura 9. Distribución mundial del virus de la influenza.** Mapa de la situación de los casos de influenza, incluyendo por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09, hasta el 5 de noviembre del 2011. Tomado de la página oficial de la OMS (URL<sup>5</sup>).

### 1.7. Vacunación contra los virus de influenza.

La vacunación es una manera efectiva de reducir la morbilidad y mortalidad de la influenza, pero su eficacia varía año con año (Deem & Pan, 2009). Actualmente, las vacunas contra los virus de la influenza están diseñadas principalmente para la generación de inmunidad mediada por anticuerpos, incluyendo los dirigidos contra la HA, estos últimos son los únicos capaces de prevenir la infección (Hensley, 2009).

La eficacia de la producción vigente de vacunas es limitada, ya que se requieren dos huevos embrionados por dosis de vacuna; cada huevo embrionado debe ser desinfectado, inoculado con el virus, incubado, cosechado y luego purificado. Adicionalmente, las cepas virales deben adaptarse al huevo y seguir un número serial de pases antes de proceder a su inactivación (Ambrozaitis *et al.*, 2009).

Para la adaptación de la cepa de virus de influenza en embriones de pollo, se pueden emplear dos técnicas: reordenamiento con virus adaptados o por genética reversa; ambas generan una cepa vacunal capaz de replicarse eficientemente en huevo embrionado debido a que se aumenta su afinidad por el ácido N-acetilneuramínico  $\alpha$ 2,3-galactosa y mantiene su facultad de unión al ácido N-acetilneuramínico  $\alpha$ 2,6-galactosa (Chen *et al.*, 2010).

El proceso de pases a través de los huevos embrionados crea una variante de alta tasa de replicación, pero pueden introducirse mutaciones a la HA que interfieren en la inmunogenicidad de la vacuna; por ello se requiere de pruebas clínicas para establecer la eficacia, seguridad, posibles efectos adversos, dosis óptima y dosificación (Neuzil & Bright, 2009). Además, cada año la OMS realiza un sondeo para reformular la vacuna dependiendo de las cepas circulantes. En febrero del 2010, la OMS recomendó que la vacuna para influenza estacional para el hemisferio norte (invierno 2011-2012) estuviera compuesta con los virus A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) y B/Brisbane/60/2008 (URL<sup>6</sup>).

### 1.8. Métodos de diagnóstico

El aislamiento y cultivo en tejido de los virus fue el estándar de oro para el diagnóstico de enfermedades respiratorias; hasta que, aproximadamente a la mitad de la década de 1990, se avalaron los ensayos de RT-PCR para uso clínico (Beck *et al.*, 2009). Inmediatamente después del reconocimiento del nuevo virus de la influenza A(H1N1)pdm09, la secuencia de éste se publicó en la Iniciativa Global para Compartir Datos de Influenza Aviar (GISAID por su siglas en inglés); con esta información se diseñaron y distribuyeron kits de RT-PCR en tiempo real específicos para el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 (Panning *et al.*, 2009).

El análisis de los ácidos nucleicos por RT-PCR reemplazó al cultivo tradicional del virus, disminuyendo el tiempo para obtener los resultados y aumentando la sensibilidad, ya que es altamente específico para los subtipos de influenza. Debido a lo anterior, la OMS aconsejó que el ensayo preferente para determinar un caso positivo de influenza A(H1N1)pdm09 sea RT-PCR en tiempo real. Sin embargo, hay factores que tienen influencia en la sensibilidad del análisis de ácidos nucleicos, incluyendo la tardada recolección de muestras, el muestreo inadecuado, iniciación previa de tratamiento con antivirales, la presencia de inhibidores y la recolección de muestras en el tracto respiratorio superior en pacientes con neumonía (Martínez-Sobrido *et al.*, 2009).

No obstante existen ensayos inmunológicos que permiten cuantificar la respuesta de anticuerpos contra el virus; los métodos clásicos son los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI) y la microneutralización (MN) (Wang *et al.*, 2008). La detección de anticuerpos es crítica para evaluar la prevalencia y diseminación de la cepa del virus de la influenza A(H1N1)pdm09. Los ensayos serológicos son usados en estudios epidemiológicos ya que tienen dos ventajas basadas en la biología del virus de influenza: 1) la infección por estos virus induce la producción de anticuerpos específicos para la cepa (Ndifon *et al.*, 2009); y 2) estos ensayos permiten hacer una detección aun cuando el virus ya no está presente o cuando hay una infección subclínica. A pesar de que la HI es la técnica más empleada, los ensayos de MN han mostrado una mayor sensibilidad, incluso obteniendo un título de anticuerpos en muestras negativas por HI (Leuwerke *et al.*, 2008).

Los problemas asociados con el empleo de ensayos de HI son la presencia de inhibidores en suero, la variabilidad en la capacidad de las HAs de diferentes cepas para aglutinar y los frecuentes cambios antigénicos que presentan. En el caso de los ensayos de MN, se detectan anticuerpos encargados en prevenir la infección de las células empleadas durante la prueba, de ahí el término “neutralización” (Leuwerke *et al.*, 2008). Las principales ventajas que muestran los ensayos de MN son que se detectan anticuerpos funcionales contra la HA de una cepa específica y que no requieren de la producción de proteínas recombinantes o purificadas (Rowe *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2011).

Estas pruebas son sensibles y específicas para determinar el título de anticuerpos contra la HA viral, pero el uso de virus “vivos” en la MN limita su aplicación a laboratorios con niveles de bioseguridad 3 cuando son nuevos virus o altamente patógenos (Wang *et al.*, 2008). Una alternativa para emplear la MN en laboratorios con niveles de bioseguridad 2 sin comprometer las exigencias de sensibilidad, especificidad, seguridad y reproducibilidad, es el empleo de pseudotipos retrovirales (Kolokoltsov *et al.*, 2006).

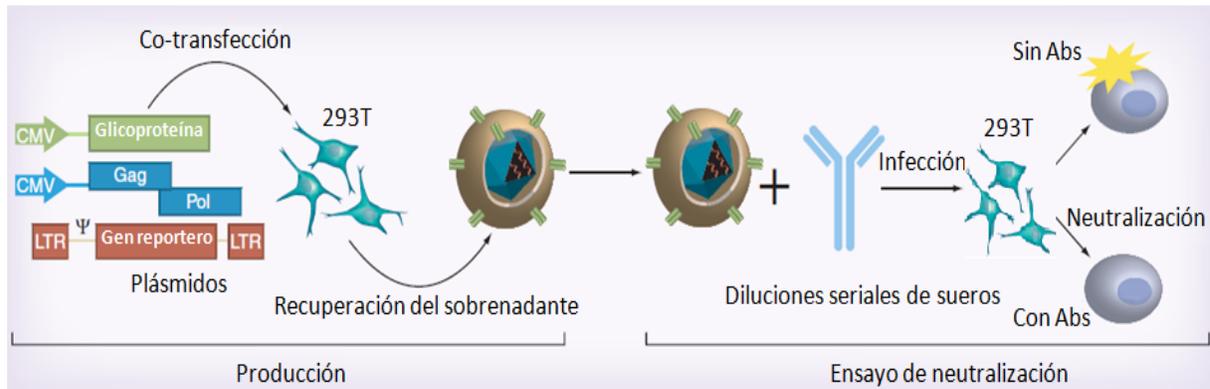
### 1.9. Pseudotipos retrovirales.

Los pseudotipos retrovirales son partículas virales quiméricas que portan proteínas derivadas del agente en estudio y, por consecuencia, poseen afinidad a los receptores naturales del virus de procedencia (Cronin *et al.*, 2005; García & Lai, 2011). Los pseudotipos retrovirales comprenden la glicoproteína del virus de interés, el genoma incompleto de un retrovirus (principalmente se emplean HIV o MLV) y un gen reportero. (Giroglou *et al.*, 2004; Nefkens *et al.*, 2007).

Los pseudotipos retrovirales llevan a cabo los pasos de infección que incluyen unión, fusión, transcripción reversa e inserción del gen reportero; pero no son capaces de generar una progenie infecciosa. Entre las ventajas de la aplicación de pseudotipos retrovirales con la HA del virus de la influenza, se tienen:

- No son virus replicativos, por lo que se pueden manejar en niveles de bioseguridad 2, y así ser compatibles con la mayoría de los laboratorios.
- Sólo se expresa la HA del subtipo del virus de influenza, sin generarse la posibilidad de recombinación o escape del virus.
- Permite un ensayo rápido y sencillo para determinar respuesta de anticuerpos, usando HA de diferentes linajes, sin la necesidad de aislar a cada uno de diferentes muestras (Wang *et al.*, 2008).
- El análisis de los resultados es más sensible porque se expresan genes reporteros; la transferencia de estos genes a las células blanco depende únicamente de la glicoproteína de superficie.
- El uso de envolturas virales ajenas al virus estudiado evita un sesgo en los resultados (Temperton *et al.*, 2007).

Las proteínas ancladas en la envoltura viral son el blanco primario para la respuesta mediada por NAbs, por lo que pueden emplearse los pseudotipos retrovirales para determinar el título de NAbs sin requerir de virus replicativos durante el ensayo (Figura 10). Algunos grupos de investigación han reportado el uso de pseudotipos retrovirales en ensayos de neutralización (Kong *et al.*, 2006; Nefkens *et al.*, 2007; Temperton *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Alberini *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2009; Labrosse *et al.*, 2010 y Wang *et al.*, 2010a).



**Figura 10. Producción de pseudotipos retrovirales y su uso en ensayos de microneutralización.** Plásmidos que contienen los genes que codifican a la glicoproteína de superficie, la cápside (Gag-pol) y el gen reportero se transfectan a la línea celular 293 T. Después de unos días, los pseudotipos retrovirales son recuperados en el sobrenadante, filtrados y pueden emplearse para ensayos de neutralización. Si se presentan anticuerpos contra la glicoproteína, no se detectará la señal del gen reportero. (Modificado de García & Lai, 2011).

En comparación con HAs de otros virus de influenza estacionales, la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09, se considera una proteína menos estable. Se ha reportado que al producirse como proteína recombinante puede formar monómeros o agregados; y en estudios empleando pseudotipos retrovirales que portan la HA de este virus, han presentado una baja capacidad infectiva en células 293T. Por ello, para aumentar la infectividad de los pseudotipos retrovirales, el grupo de Wang y colaboradores en el 2010 adicionalmente co-expresaron los genes que codifican a las proteínas NA y M2 del virus pandémico del 2009. El mecanismo que explica este potenciamiento sinérgico actualmente se desconoce (Wang *et al.*, 2010b).

Una posibilidad para incrementar la estabilidad de la HA viral es mediante la introducción de mutaciones que puedan formar nuevas interacciones intra- o inter- monómeros (Rachakonda *et al.*, 2007). La HA del virus de influenza A(H1N1)pdm09 ha mantenido una secuencia homogénea (Yang *et al.*, 2010), asimismo la posición de aminoácidos que forman puentes disulfuro es altamente conservado; por ello la variación en la estabilidad de diferentes HAs se adjudica a interacciones no covalentes entre monómeros (Huang *et al.*, 2003).

Se ha descrito la sustitución E374K en la región HA2 para aumentar la estabilidad de la proteína, manteniendo la unión entre las dos subunidades (Yang *et al.*, 2010), y la introducción de la mutación

Q223R en la HA de pseudotipos retrovirales que contienen la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 para aumentar la infectividad sin modificar la antigenicidad.

Este tipo de modificaciones hace a los pseudotipos retrovirales que contienen la HA del virus pandémico del 2009, más adecuados para estudios de neutralización (Wang *et al.*, 2010b).

#### *1.10. Estudios de seroprevalencia.*

Las determinaciones de seroprevalencia contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 proveen de información valiosa para establecer y en su caso re-dirigir estrategias de inmunización, y determinar la probabilidad de nuevas olas de infección (Yang *et al.*, 2010). Para la construcción de modelos de transmisión de la enfermedad se requiere del entendimiento de la epidemiología del virus, en particular de su potencial de diseminación en la población. En el caso de no contar con una medición serológica directa, el perfil de la inmunidad debe ser estimado con tasas de casos clínicos ajustados a edades específicas. Una de las limitaciones de la vigilancia clínica es que está basada en los individuos que presentan síntomas de la infección y no consideran personas asintomáticas o con síntomas leves (Miller *et al.*, 2010).

Durante la etapa de la pandemia, se llevaron a cabo acciones tempranas para mitigar los efectos clínicos y sociales por varios países, incluyendo la vigilancia de casos probables de H1N1, escaneo en aeropuertos, cuarentena y terapia antiviral en casos probables; pero la efectividad de estas intervenciones permanece cuestionable (Chao *et al.*, 2011).

Para el final de marzo del 2011 se contaba con algunos estudios serológicos, dirigidos a la influenza pandémica del 2009. La mayoría de las publicaciones se enfocaron en la respuesta cruzada de anticuerpos preexistentes contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09, en vez de explorar la epidemiología de la pandemia por títulos serológicos. En el Reino Unido se detectó alrededor del 20% de personas mayores de 65 años con anticuerpos con reacción cruzada con el virus de la influenza A(H1N1)pdm09, mientras que en grupos de menor edad fueron bajos los niveles de seroprevalencia (1.8-9.8%). Tendencias similares se encontraron en EE.UU., Italia, Taiwan, Nueva Zelanda y Australia. En muestras de personas mayores de 85 años se presentó hasta un 60% de seropositividad. En contraste en Singapur y Hong Kong la seroprevalencia en todos los grupos de edad fue igual o menor a un 5%. La variabilidad de los ensayos serológicos de influenza es evidente al comparar los

resultados entre laboratorios; lo anterior se atribuye a los diferentes protocolos y puntos de corte establecidos para clasificar los casos positivos (Broberg *et al.*, 2011).

Es reducido el número de estudios donde comparan las muestras obtenidas antes y después de la pandemia de influenza. En el Reino Unido se observó que los niños aumentaron considerablemente los títulos de anticuerpos por el ensayo de HI (de 1.8 a 23% en niños de 0 a 4 años, y de 3.7 a 46% en niños de 15 a 14 años); pero el grupo de jóvenes de más de 25 años no presentaron diferencia en el porcentaje de positivos (Miller *et al.*, 2010). En EE.UU. la seroprevalencia global contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 de los sueros analizados fue de un 21%, siendo considerablemente superior que el 6% obtenido en el 2008; la prevalencia mayor fue en niños de 10 a 19 años (46%). Del 27% de seroprevalencia en las muestras analizadas en Nueva Zelanda, los niños tuvieron un aumento en la seropositividad del 14 al 47% (de 5 a 19 años), mientras que los adultos mayores de 60 años no se encontró diferencia significativa conforme al estudio realizado entre el 2004 a 2009 previo a la pandemia de influenza A(H1N1)pdm09. En investigaciones realizadas en Australia, China, Noruega y Singapur también se reportó el mayor aumento en niños menores de 14 años (Broberg *et al.*, 2011).

Los trabajadores de la salud están expuestos a muchos agentes infecciosos y por ello pueden servir como transmisores de enfermedades a otros pacientes o entre los mismos trabajadores. Durante la reciente pandemia del 2009, los trabajadores de la salud tuvieron que enfrentar los inicios de la pandemia sin guías acerca de la transmisión de la enfermedad y prevención. Los manuales del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de los EE.UU y de la OMS fueron publicados semanas después del inicio de la pandemia. Existen pocos datos epidemiológicos de la influenza A(H1N1)pdm09 en trabajadores de la salud. En los EE.UU. el primer reporte casos de influenza H1N1 entre los trabajadores de la salud, sugirió que aproximadamente un 50% de ellos pudieron haber contraído la infección dentro del área de trabajo. Actualmente, los reportes publicados incluyen pocos datos que permitan diferenciar a los trabajadores de la salud y si mantienen contacto directo o no con pacientes (Balkhy *et al.*, 2010) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Estudios de seroprevalencia de la influenza A(H1N1)pdm09 enfocados a trabajadores de la salud.

Lugar de Estudio	Resultado, % positivos (edad)	n	Método empleado	Punto de corte	Referencia
EE.UU., Tennessee	89 (>55); 18% neutralizan contra la influenza pandémica del 2009, efecto de la vacuna de 1976	116	Comparación de HI y MN	Título $\geq 1:40$ para HI y $\geq 1:160$ para MN	Broberg <i>et al.</i> , 2011
Taiwan	20 (36.9+/-10.6), 2.9 control; 30.8% primera línea de riesgo, 12.6% segunda línea de riesgo	295	HI	$\geq 1:40$	Chan <i>et al.</i> , 2010
Australia	19.9 vs 15.3 del grupo control; en la segunda muestra, de 87 sólo uno aumentó cuatro veces el título de NAbs	231	HI	$\geq 1:40$	Marshall <i>et al.</i> , 2011
México, comparación de grupos de riesgo (Monterrey)	24.6 (38.1+/-10); detección por ELISA	309	ELISA	Absorbancia $\geq 2$	Elizondo-Montemayor <i>et al.</i> , 2011
Japón, Kobe, medidas de protección	5.2; 60.4% de los trabajadores se expusieron a pacientes con influenza, de los cuales 6.8% fueron positivos vs 3.1% de los que no se expusieron (no significativo)	268	HI	$\geq 1:40$	Toyokawa <i>et al.</i> , 2011
China, Hong Kong, sin vacuna contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09	12.4 total; 16 (19-24), 20 (25-34), 13 (35-44), 7.4 (45-54), 8.3 (55-64)	599	MN	$\geq 1:40$	Zhou <i>et al.</i> , 2011
Nueva Zelanda	26.7 total; 29.6 (médico, enfermeras), 25.3 (auxiliares)	1156	HI	$\geq 1:40$	Bandaranayake <i>et al.</i> , 2010

La mayoría de los estudios realizaron ensayos de HI, por lo que al comparar con el trabajo en EE.UU. donde realizan a la par ensayos de HI y de MN, se demostró que no todos los anticuerpos con reacción cruzada contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 son neutralizantes; de 89% de personas positivas por ensayos de HI (mayores de 55 años), sólo 18% de los participantes presentaron NAbs. (Broberg *et al.*, 2011).

### 1.11. *Justificación.*

El surgimiento de la pandemia de la influenza A(H1N1)pdm09, expuso uno de los mayores retos para delimitar y contener los brotes de infección, así como para precisar el porcentaje de población expuesta al virus. En nuestro país, se ha determinado el número de casos de influenza pandémica con base en los ensayos de RT-PCR en tiempo real, pero la detección de anticuerpos es crítica para evaluar la prevalencia y diseminación del virus. Los ensayos de MN permiten detectar NAbs, es decir anticuerpos funcionales capaces de prevenir la infección, asimismo presentan una mayor sensibilidad que los ensayos de HI. Sin embargo, debido a la variabilidad de las cepas virales entre laboratorios y las limitaciones a niveles de bioseguridad altos cuando son virus altamente patógenos, se ha propuesto el uso de pseudotipos retrovirales como herramienta para medir la neutralización evitando el uso de virus replicativos. Los ensayos de MN empleando pseudotipos retrovirales han tenido una excelente correlación de títulos de NAbs con ensayos de MN clásicos, haciéndolos convenientes principalmente por reducir la variación en los ensayos de MN mediante la detección de la señal de un gen reportero. Por a lo anterior, el presente trabajo se enfocó en un estudio en doble ciego de seroprevalencia de influenza, en trabajadores de la salud del IMSS, aplicando ensayos de microneutralización con pseudotipos retrovirales.

Esta población de estudio representa un grupo de alto riesgo porque el IMSS provee atención médica a más de 40 millones de personas en nuestro país, en 1 099 unidades de atención médica primaria y 259 hospitales a lo largo del país; además esta institución ha reportado el mayor número de casos y muertes por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.

Asimismo, la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 ha presentado inestabilidad estructural en comparación de otras HAs; debido a esto los pseudotipos retrovirales portadores de esta glicoproteína requieren de la incorporación de las proteínas M2 y NA del virus pandémico, y su uso como proteína recombinante se compromete. Ya que las posiciones de aminoácidos formadores de puentes disulfuro son altamente conservados, la variación en la estabilidad de diferentes HAs se adjudica a interacciones no covalentes entre monómeros. Por ello, adicionalmente se buscaron, en la región del tallo, sustituciones de aminoácidos que aumenten la estabilidad de esta HA formando interacciones intra- o inter-monómeros.

### 1.12. *Objetivo general.*

Determinar la seroprevalencia contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 en trabajadores del IMSS y analizar mutaciones en la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 que favorezcan su estabilidad.

#### 1.12.1. *Objetivos particulares.*

- Obtener pseudotipos retrovirales que expresen a la hemaglutinina del virus de la influenza A(H1N1)pdm09.
- Determinar la seroprevalencia en el grupo de trabajadores del IMSS.
- Buscar mutaciones en la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm2009 que pudieran aumentar su estabilidad.

### 1.13. *Hipótesis.*

Si los trabajadores de la salud son un grupo de alto riesgo, debido a que mantienen una mayor exposición con casos de influenza A(H1N1)pdm09, entonces presentarán una seroprevalencia mayor en comparación con la población en general.

Si se generan nuevas interacciones no covalentes intra- o inter-monómeros en la región del tallo de la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09, entonces se aumentará la estabilidad de la proteína sin afectar sus funciones biológicas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1. Plásmidos y líneas celulares.

Los plásmidos pVRC/SF/A/California/04/2009 HA (pCaCo), pVRC/SF/A/California/04/2009 NA (pCaNA), pVRC/SF/A/California/04/2009 M2 (pCaM2), pRT43.2Tn-b.Gal (pGal), pCAGGS-TMPRSS11D (HAT)1 (pHAT) y pIK6 1(ATG) GalV GalPol (pMLV) fueron donados por la Dra. Carol Weiss (División de Productos Virales de la FDA, Rockville, MN, EE.UU.). Estos se recuperaron a partir de papel filtro, y con ellos se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F- endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 deoR nupG lacZ $\Delta$ M15 hsdR17) para posteriormente purificarlos y transfectar células 293T/17.

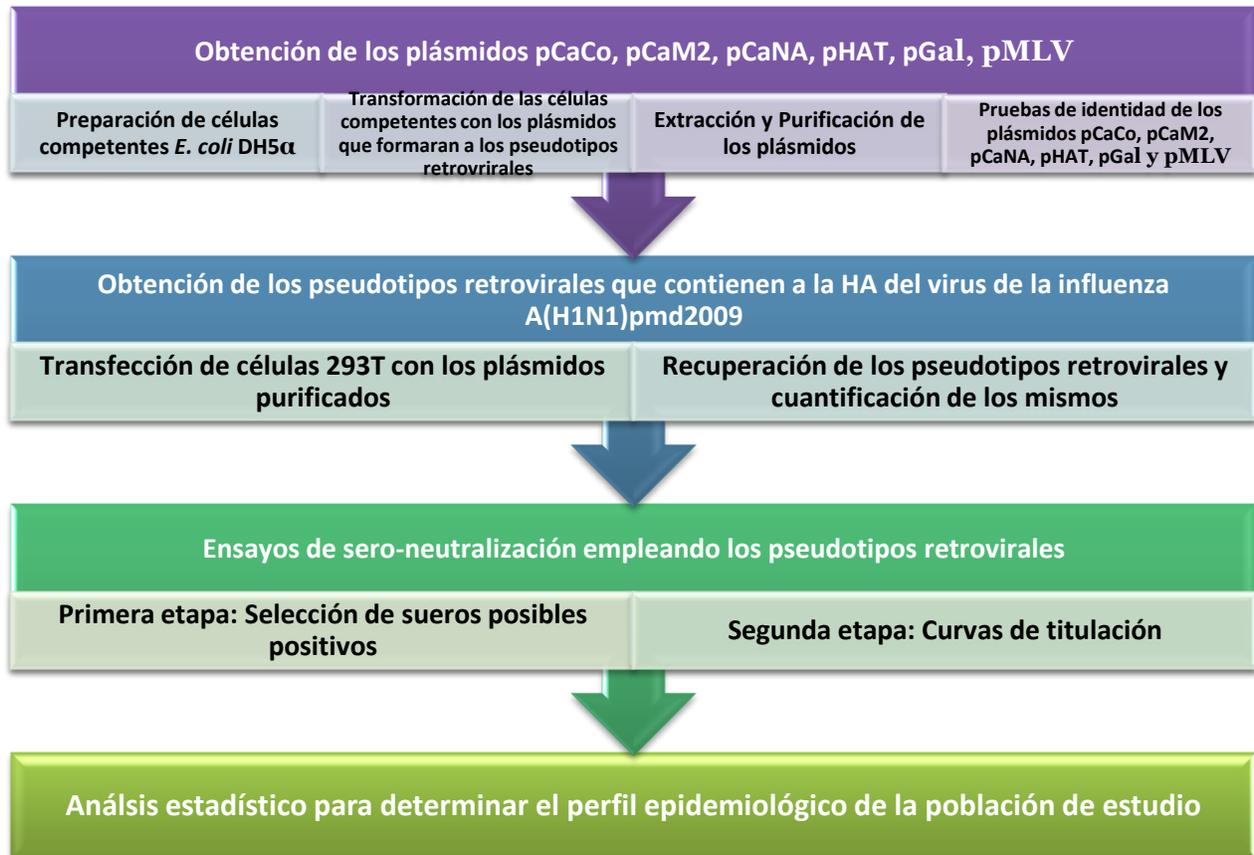
Las células 293T/17 (células humanas embrionarias epiteliales de riñón; ATCC:CRL-11268<sup>TM</sup>, Manassas, VA, EE.UU.) se cultivaron a 37°C/5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) enriquecido con aminoácidos no esenciales (100 mM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), L-glutamina (2 mM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), FBS inactivado (10%; Suero bovino fetal EmbryoMax<sup>®</sup>, Milipore, Billerica, MA, EE.UU.), HEPES (15 mM; Mayimex, Veracruz, México) y 100 IU/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomina (penicilina-estreptomina 100x Mayimex, Veracruz, México).

### 2.2. Sueros.

Los sueros se obtuvieron de 1676 trabajadores del IMSS reclutados en el año 2009, después de la tercera ola de influenza A(H1N1)pdm09 presentada en México y antes de la campaña de vacunación con la vacuna monovalente contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 (A/California/07/2009; FLUZONE<sup>®</sup>). Los sueros se inactivaron calentando 30 min a 56°C, y se almacenaron a -80°C antes del ensayo. Los trabajadores participantes firmaron una carta de consentimiento informado y la toma de muestra se realizó conforme a los lineamientos de bioseguridad y bioética del IMSS. Adicionalmente contestaron un cuestionario exhaustivo sobre los cuidados que tuvieron en su lugar de trabajo durante la pandemia, si estuvieron en contacto con alguna persona infectada, si presentaron síntomas, etc. (Véase en el Anexo I). Los sueros control (n = 55) se obtuvieron de personas que acudieron al banco de sangre; las muestras provienen de participantes los cuales no trabajan en el IMSS, por lo tanto representan a la población en general.

El desarrollo experimental se llevó a cabo en dos partes:

- I. Análisis de sueros de trabajadores: Comprendió la obtención de los pseudotipos retrovirales, los ensayos de microneutralización y el análisis de los resultados. Los ensayos de neutralización se dividieron en dos, una de escrutinio para reducir el número de muestras mediante el descarte de muestras negativas, y otra que consistió de curvas de neutralización con las muestras presuntamente positivas (Figura 11).



**Figura 11. Esquema de trabajo de la parte experimental I.** Desglose global del desarrollo experimental que se llevó a cabo para el análisis de los sueros problema.

- II. Análisis bioinformático: Se enfocó a la búsqueda de sustituciones de aminoácidos en la región de tallo de HA, con el fin de aumentar la estabilidad de la proteína (Figura 12).

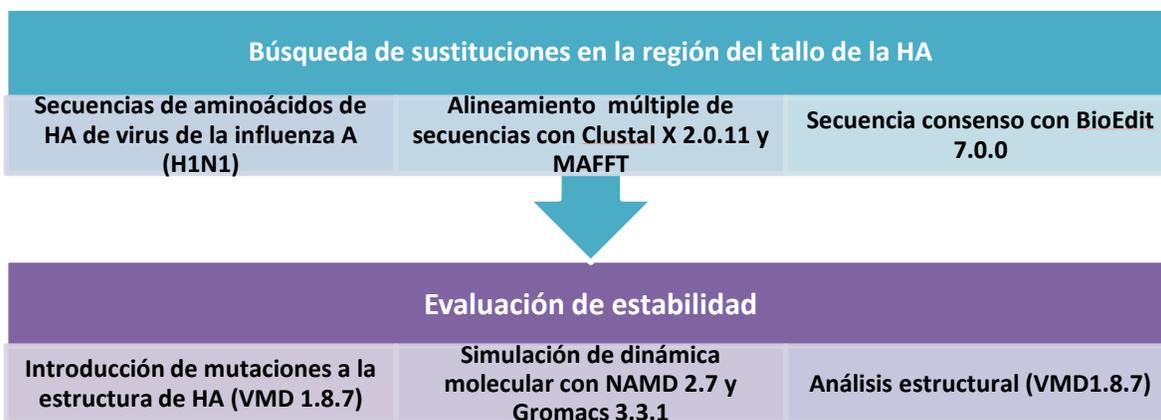


Figura 12. Esquema de trabajo de la parte experimental II. Desglose global del desarrollo experimental que se llevó a cabo para el estudio bioinformático.

### 2.3. Obtención de los vectores de expresión para generar los pseudotipos retrovirales

#### 2.3.1. Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  se cultivó en 3 mL de medio LB (Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU.), incubando por 18 h a 37 °C. Al día siguiente se inoculó con el cultivo anterior en 100 mL de medio LB, dejando a 37 °C con agitación a 500 x *g* por 1.5 h. Posteriormente se mantuvo el cultivo por 10 min en hielo, y se centrifugó a 8000 x *g* por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se disgregó agitando brevemente en un *vortex*; se agregaron 4 mL de MgCl<sub>2</sub> 0.1 M frío para resuspender completamente y se mantuvo la suspensión en hielo por 10 min. A continuación, se centrifugó por 10 min a 8000 x *g* a 4 °C, se decantó y resuspendió el paquete celular en 4 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío, dejando 30 min en hielo. De nuevo se centrifugó por 10 min a 8000 x *g* a 4 °C, se decantó y resuspendió el paquete celular en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío, manteniendo en hielo 1 h. Finalmente se almacenaron las células competentes a -70 °C hasta utilizarlas, adicionando glicerol a una concentración final del 15% (v/v) y en alícuotas de 50  $\mu$ L (Sambrook & Russell, 2001).

#### 2.3.2. Transformación de las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se adicionó 50 ng de DNA plasmídico a 50  $\mu$ L de las células competentes y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Posteriormente esta suspensión se sometió a un choque térmico por 90 s a 42 °C y se

pasó inmediatamente a hielo por 1 min. Se adicionaron 500  $\mu$ L de medio LB y se incubó 90 min a 37 °C. Se sembraron 120  $\mu$ L de las bacterias por extensión con varilla en placas con medio LB y el antibiótico correspondiente (Sambrook & Russell, 2001).

### 2.3.3. Extracción y purificación del DNA plasmídico.

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se empleó el sistema comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.); para lo cual un cultivo de bacterias que contienen el plásmido de interés se incubó por 18 h a 37 °C en 3 mL de medio LB con el antibiótico adecuado; pasando ese tiempo se centrifugó a 13000 x *g* durante 2 min. Se removió el sobrenadante para resuspender el botón celular en 250  $\mu$ L de la solución correspondiente (*cell resuspension solution*) y se añadieron 250  $\mu$ L de la solución de lisis (*cell lysis solution*), invirtiendo el tubo suavemente para mezclar. Se agregaron 10  $\mu$ L de la solución de proteasa (*alkaline protease solution*), invirtiendo cuatro veces el tubo y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min. Se adicionaron 350  $\mu$ L de la solución de neutralización (*neutralization solution*), invirtiendo cuatro veces el tubo. Se centrifugó a 13000 x *g* por 10 min. El sobrenadante se decantó en una columna cromatográfica; se agregaron 750  $\mu$ L de la solución de lavado (*wash solution*) con etanol y se dejó pasar la solución a través de la columna, repitiendo el lavado. Una vez retirado el líquido, se dejó secar la columna por 10 min y se transfirió en un tubo colector de 2 mL para centrifugar 2 min a 13000 x *g*. Posteriormente se pasó la columna a un tubo estéril, adicionando 100  $\mu$ L de agua (*nuclease-free water*) y centrifugando a 13000 x *g* por 1 min. Se realizó la cuantificación del DNA recuperado y determinación de la pureza empleando el equipo Synergy™2: Multi-Mode Microplate Reader (Biotek® Instruments, Inc. Winooski, VT, EE.UU.) y se comprobaron algunos aspectos de su calidad realizando electroforesis en gel de agarosa. El DNA se almacenó a -20°C.

La recuperación de DNA plasmídico a gran escala se llevó a cabo utilizando el sistema comercial AxyPrep Maxiprep kit® (Axygen Biosciences, Union City, CA, EE.UU.). Un cultivo de bacterias que contienen el plásmido de interés se incubó por 18 h a 37 °C en 150 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente; pasando ese tiempo se centrifugó a 3000 x *g* durante 10 min. Se removió el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 10 mL de la solución S1 (regulador para resuspender bacterias con RNasa A), agitando en *vortex*. Se agregaron 10 mL de la solución S2

(regulador de lisis), invirtiendo varias veces el tubo y colocando en hielo por 5 min. Se agregaron 10 mL de la solución S3K fría (regulador de neutralización) invirtiendo el tubo para mezclar. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se adicionaron 10 mL de solución B fría (regulador de unión a DNA), mezclando por inversión y centrifugando a 10000 x *g* por 10 min a 4 °C.

El sobrenadante se filtró, haciéndolo pasar a través de una jeringa Maxiprep, transfiriendo el contenido a una columna limpia para agregar 12 mL de la solución W1 (regulador de lavado). Una vez que sale la solución W1 de la columna, se hicieron pasar 14 mL de solución W2 (regulador para eliminar sales) a través de la columna. Se colocó la columna en un tubo de 50 mL, se agregaron 4 mL de solución W2 y se centrifugó a 8000 x *g* por 10 min a 4 °C. Posteriormente se transfirió la columna a un tubo nuevo de 50 mL y se adicionaron 1.5 mL de agua destilada, dejando 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8000 x *g* por 5 min para recuperar el DNA plasmídico. Se realizó la cuantificación del DNA recuperado y determinación de la pureza empleando el equipo Synergy™2: Multi-Mode Microplate Reader y se comprobó su calidad realizando electroforesis en gel de agarosa. El DNA se almacenó a -20°C.

#### *2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa.*

Una cantidad de agarosa para una concentración final de 0.8%, se disolvió en TBE 1x (90 mM Tris-boratos, 2 mM EDTA) calentando en microondas hasta que la agarosa se disolvió totalmente para verterla sobre el molde de la cámara de electroforesis, y se dejó gelificar. Una vez gelificado, se retiraron los separadores y peine, y se colocó el gel en la cámara de electroforesis, agregando TBE 0.5x hasta cubrirlo. A cada muestra de DNA se le añadió 1/10 de volumen de regulador de carga (6 mM EDTA pH 8, 25 % v/v glicerol, 1 % v/v SDS, 0.25 % m/v de azul de bromofenol).

El marcador de tamaño molecular (MTM), DNA del fago λ (λDNA) (Invitrogen; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) restringido con la enzima PstI, se empleó como referencia para determinar el tamaño del fragmento amplificado. Las muestras se sometieron a 100 V el tiempo necesario para la separación de la banda amplificada. Finalmente tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (Sambrook & Russell, 2001).

### *2.3.5. Reacción de restricción enzimática de los plásmidos.*

Para la digestión con enzimas de restricción se colocó 1 µg del plásmido extraído, 2 µL de regulador compatible para las enzimas empleadas, 5 U de las enzimas seleccionadas con base en el mapa del vector y lo necesario de agua desionizada y esterilizada para completar 20 µL de reacción. Se mezcló y se centrifugó a 10000 x *g* por 20 s, incubando 18 h a 37 °C. Posteriormente el patrón de restricción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa (Sambrook & Russell, 2001).

## *2.4. Obtención de pseudotipos retrovirales y su empleo en ensayos de microneutralización.*

### *2.4.1. Producción de pseudotipos retrovirales.*

Se cultivaron  $5 \times 10^6$  células 293T con medio DMEM sin antibióticos, en placas de cultivo celular de 100 cm<sup>2</sup>, 18 h antes de la transfección a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se mezclaron en *vortex* 60µL de Fugene 6 (Roche, Basel, Suiza) y 600 µL de medio Opti-MEM1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se incubó a temperatura ambiente 5 min. A esta mezcla se le añadieron los plásmidos purificados: 2.5 µg del plásmido pHAT, 5.5 µg de plásmido de pGal, 5 µg del plásmido pMLV, 0.5 µg del plásmido pCaCo, 2.5 µg del plásmido pM2 y 4 µg del plásmido pCaNA; se agitó en *vortex* e incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Después de concluir el tiempo de incubación, se adicionó la mezcla Fugene-plásmido gota a gota a las células 293T, agitando suavemente para cubrir toda la monocapa. Se incubaron 24 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez pasadas las 24 h se removió el medio, se adicionaron 20 mL de medio DMEM completo y se continuó la incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. A las 48, 72 y 96 h post-transfección se recolectó el sobrenadante y éste se hizo pasar, en condiciones de esterilidad, a través de un filtro de 0.45 µm; añadiendo 20 mL de medio DMEM completo entre las cosechas. Finalmente se conservó el filtrado en alícuotas de 2 mL a -80 °C (Wang *et al.*, 2008).

### *2.4.2. Cuantificación de los pseudotipos retrovirales.*

Se sembraron, en placas blancas de 96 pozos para cultivo celular,  $2.5 \times 10^5$  células 293T con 100 µL de medio DMEM completo por pozo. Las placas se dejaron 30 min a temperatura ambiente y luego se incubaron 18 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> antes de usar. Se hicieron diluciones seriales de los pseudotipos retrovirales, siguiendo un factor de 1:5, en medio DMEM completo adicionado de 16 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania). Posteriormente se removió el medio de las placas blancas y se les adicionó a la monocapa 100 µL de las diluciones de pseudotipos (NOTA: Se debe

incluir un control que contenga únicamente DMEM completo con polibreno). Las placas se centrifugaron a 500 x *g* por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron por a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de 40 a 48 h de incubación total, se removió el medio de las células y se lavaron con 100 µL de DPBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.7 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), empleando el lavador de microplacas EL406 de BioTek. Se adicionaron 25 µL de regulador de lisis 1x, incubando 10 min a temperatura ambiente con agitación (500 x *g*). Se cuantificó la expresión del gen reportero mediante el sistema comercial Galacto-Star® (Applied Biosystems, Bedford, MA, EE.UU.), para lo cual se preparó una solución 1:50 del sustrato y se adicionaron 100 µL del mismo a las células una vez concluido el tiempo de incubación; se dejaron en agitación (500 x *g*) a temperatura ambiente durante 1 h. Las lecturas de luminiscencia se realizaron empleando el equipo Synergy™2: Multi-Mode Microplate Reader con el programa Gen5™ para Windows y los resultados se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2007 (Wang *et al.*, 2008).

#### *2.4.3. Ensayos de microneutralización de la HA viral.*

##### *2.4.3.1. Primera etapa: Selección de sueros presuntamente positivos.*

Se sembraron 2.5x10<sup>5</sup> células 293T con 100 µL de medio DMEM completo en placas blancas de 96 pozos para cultivo celular, incubando de 18 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> antes de usar. Se diluyó el suero problema 1:40 con medio DMEM completo en placas de polipropileno; a estas diluciones se les adicionó el mismo volumen de pseudotipos retrovirales ajustados a 10000 unidades relativas de luminiscencia (URL) con polibreno (concentración final de 16 µg/mL) y se incubó la placa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por una hora (volumen final de aproximadamente 400 µL). Por otra parte, se removió el medio de las células y se adicionaron 100 µL de la mezcla de suero-pseudotipo, se centrifugó a 500 x *g* por 10 minutos a temperatura ambiente e incubó a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 40 a 48 h de incubación, se removió el medio y se lavaron las células con 100 µL de DPBS. Se removió el DPBS para adicionar 25 µL de regulador de lisis 1x e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con agitación (500 x *g*), en este tiempo se preparó el sustrato y se realizó el ensayo de luminiscencia como se describió anteriormente (Cuantificación de pseudotipos).

Los resultados se exportaron al programa Microsoft Office Excel 2007 para seleccionar algunos sueros que presentaron un porcentaje de neutralización mayor o igual a 50%, y así descartar los sueros negativos. El porcentaje de neutralización se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%Neutralización = 100 - \left( 100 \left( \frac{URL\ suero - URL\ células\ control}{URL\ pseudotipos\ control - URL\ células\ control} \right) \right)$$

Muestras que se consideraron positivas en esta etapa de escrutinio, se emplearon en la segunda etapa de realización de curvas de titulación (Wang *et al.*, 2008).

#### 2.4.3.2. Segunda etapa: Curvas de titulación de sueros separados en la primera etapa.

Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células 293T con 100  $\mu$ L de medio DMEM completo en placas blancas de 96 pozos para cultivo celular, incubando 18 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> antes de usar. Se preparó una pre-dilución 1:5 de suero con 120  $\mu$ L de medio DMEM completo, y se realizaron diluciones seriadas 1:2 (volumen final 75  $\mu$ L). Se preparó una dilución de pseudotipos retrovirales ajustados a 10000 URL con polibreno (concentración final de 16  $\mu$ g/mL) y se adicionó el mismo volumen a las diluciones de sueros. Se incubó la placa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por una hora. Posteriormente, se removió el medio de las células y se les adicionaron 100  $\mu$ L de la mezcla de suero-pseudotipo, se centrifugó a 500 x *g* por 10 min a temperatura ambiente e incubó a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 40 a 48 h de incubación, se removió el medio y se lavaron las células con 100  $\mu$ L de DPBS. Se removió el DPBS, se lisaron las células y se reveló como se describió anteriormente (Cuantificación de pseudotipos). Los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prism® Versión 5.0, para Windows (Wang *et al.*, 2008).

#### 2.5. Análisis estadístico.

Se compararon las proporciones de resultados positivos, obtenidos durante la primera etapa, entre trabajadores de la salud y el grupo de donadores de sangre, mediante una prueba de  $\chi^2$ . Adicionalmente se analizaron las variables discretas mediante pruebas de  $\chi^2$  y aquellas diferencias que resultaron significativas se les determinó la razón de momios con un intervalo de confianza del

95% (IC95%). Para comparar múltiples variables continuas dentro de las variables categóricas se utilizó un análisis de varianzas de una vía de ANOVA con corrección de Bonferroni.

Se manejaron pruebas de t de Student para examinar los títulos de anticuerpos comparando entre variables dicotómicas. Los títulos de NABs se obtuvieron aplicando regresión logística de cuatro parámetros (4PL) a las curvas de neutralización, tomando como base un 50% de neutralización. Se calculó la media geométrica de los títulos (GTM, por sus siglas en inglés), los valores se transformaron a su logaritmo base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) antes de calcular la media y asociar los IC95%, los GTMs se obtuvieron calculando el inverso del valor logarítmico. El valor de diferencia significativa manejado en las pruebas estadísticas fue de  $p < 0.05$ , con un IC95%. Se emplearon los programas Stata/SE 9.2, para Windows y GraphPad Prism® Versión 5.0, para Windows.

## 2.6. Análisis bioinformático.

### 2.6.1. Búsqueda de sustituciones de aminoácidos.

Las secuencias correspondientes a las HAs de diferentes virus de influenza A H1N1, se obtuvieron de la base de datos *Influenza Virus Resource* del NCBI. Las 2440 secuencias descargadas, de 566 aminoácidos de longitud (en promedio), se alinearon con el programa Clustal X 2.0.11 y, a partir de éste alineamiento múltiple, se calculó la secuencia consenso utilizando las herramientas del programa BioEdit 7.0.0. Adicionalmente se realizó otro alineamiento múltiple, descargando 2702 secuencias y empleando el programa MAFFT v6.240 (URL<sup>1</sup>), para incluir secuencias de virus aislados recientemente. De igual modo, se obtuvo la secuencia consenso con BioEdit 7.0.0. A partir de las secuencias consenso se buscaron sustituciones en la región del tallo de la HA, que inicia aproximadamente en el residuo 315. Las sustituciones seleccionadas fueron aquellas que podrían formar nuevas interacciones intra- o inter- monómeros, para lo cual se buscaron en la estructura cristalizada de la HA (PDB: 3M6S) y se observaron los residuos cercanos para verificar si se podría formar una nueva interacción. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron a la estructura de la HA (PDB: 3M6S o 3LZG), empleando las herramientas de mutagénesis del programa PyMOL v0.99 y VMD: Visual Molecular Dynamics versión 1.8.7 para Windows.

### 2.6.2. Evaluación de estabilidad: Dinámica molecular.

Las simulaciones de dinámica molecular consideran a átomos y moléculas como partículas que se mueven en una celda, y se rigen por leyes de la mecánica clásica. Las fuerzas que actúan en estas partículas se basan en funciones de potenciales de energía. Con lo anterior, se pueden calcular las trayectorias de los átomos gracias a la resolución de ecuaciones usando campos de fuerzas empíricos, con lo cual se hace una aproximación del comportamiento de sistemas biológicos a nivel atómico (Balbuena & Seminario, 1999). Las coordenadas de los átomos de las proteínas, ácidos nucleicos o lípidos de interés, así como de moléculas de agua y iones, son obtenidos de estructuras cristalográficas conocidas. Para las simulaciones se emplearon dos programas: NAMD, Molecular Dynamics Software versión 2.7 (Phillips *et al.*, 2005) y Gromacs v3.3.1 (Lindahl *et al.*, 2001). En el caso de la simulación con NAMD 2.7, se crearon las cadenas polipeptídicas, se agregaron iones y moléculas de agua al sistema empleando la opción para modelación automática del programa VMD 1.8.7 (Humphrey *et al.*, 1996). El cubo de agua se creó con base en el modelo TIP3P y mide 12 Å a partir de los extremos de la proteína; se adicionaron iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para neutralizar las cargas de la proteína y proveer de una concentración iónica de 0.5 M. El campo de fuerza empleado fue CHARMM 22, en condiciones periódicas, es decir, se crearon un número infinito de celdas idénticas en la celda de simulación para permitir el flujo de moléculas, evitando pérdidas de las mismas. Se realizó la simulación de 2 ns a 600K y presión constante (1 atm) de la HA silvestre (PDB:3M6S) y la HA mutada. Los resultados se analizaron con el programa VMD 1.8.7 utilizando las herramientas RMSD Trajectory Tool, para calcular el valor de RMSD global de las estructuras, y Timeline, para determinar las gráficas de RMSD por residuo y de comportamiento de estructuras secundarias a través de la simulación.

Para el programa Gromacs v3.3.1 se usó como molde la secuencia del PDB: 3LZG, que contiene una molécula de ácido siálico en el sitio de unión a receptor. Se adicionaron iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> a una concentración final de 0.5 M. El cubo de agua se creó utilizando el paquete Amber's Tools v1.5, adicionando un cubo de agua (modelo TIP3P) de 9 Å de distancia a partir de los iones y neutralizaron las cargas. Se llevaron a cabo simulaciones de 5 ns a 300 K y 400 K, de la HA silvestre y mutada, empleando el campo de fuerza GLYCAM06 en condiciones periódicas y a presión constante (1 atm); los resultados se analizaron con la herramienta Timeline, VMDICE y RMSD Trajectory Tool de VMD 1.8.7.

### 3. RESULTADOS.

#### I. Análisis de sueros de trabajadores.

Los plásmidos que portan los genes necesarios para la producción de pseudotipos retrovirales se recuperaron a partir de papel filtro y se emplearon para transformar a células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. A partir de las clonas generadas, se recuperó el DNA plasmídico, se realizaron ensayos de digestión enzimática y secuenciación para corroborar la identidad de los genes requeridos para producir pseudotipos retrovirales (Sandoval, 2011). Las clonas que contenían los plásmidos pCaCo, pCaM2, pCaNA, pHAT, pGal y pMLV fueron conservadas y, para obtener el DNA plasmídico a gran escala, se crecieron en medio LB con el antibiótico correspondiente, obteniendo los siguientes resultados de pureza y concentración (Tabla 3):

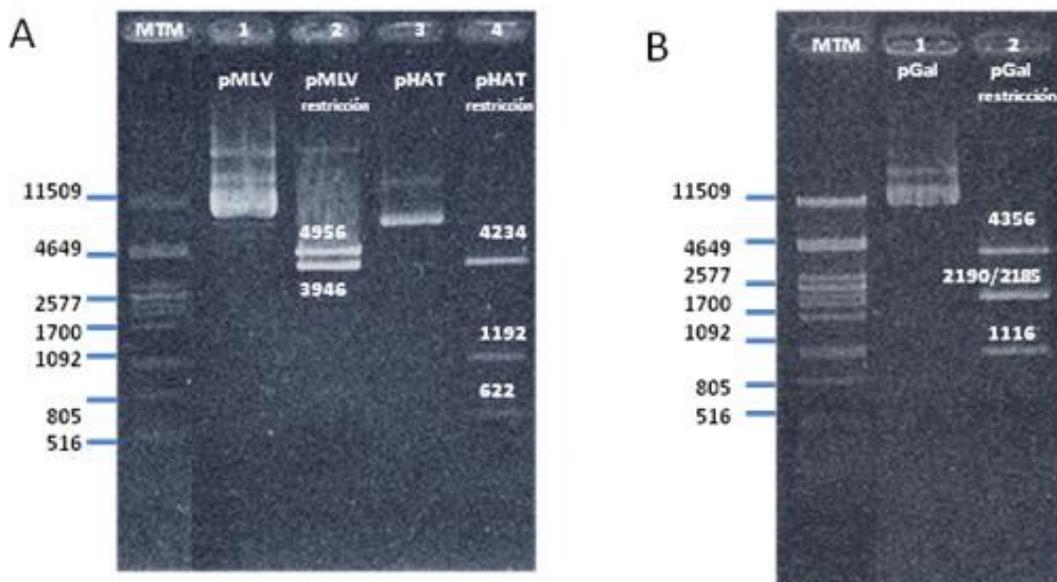
**Tabla 3.** Concentración y pureza de los plásmidos recuperados para la producción de pseudotipos retrovirales.

Plásmido	[ng/ $\mu$ L]	Relación 260/280
pCaNA	415.36	2.02
pGal	446.6	1.9
pHAT	297.41	2.0
pCaCo	369.38	1.9
pCaM2	100.02	1.82
pMLV	314.91	1.92

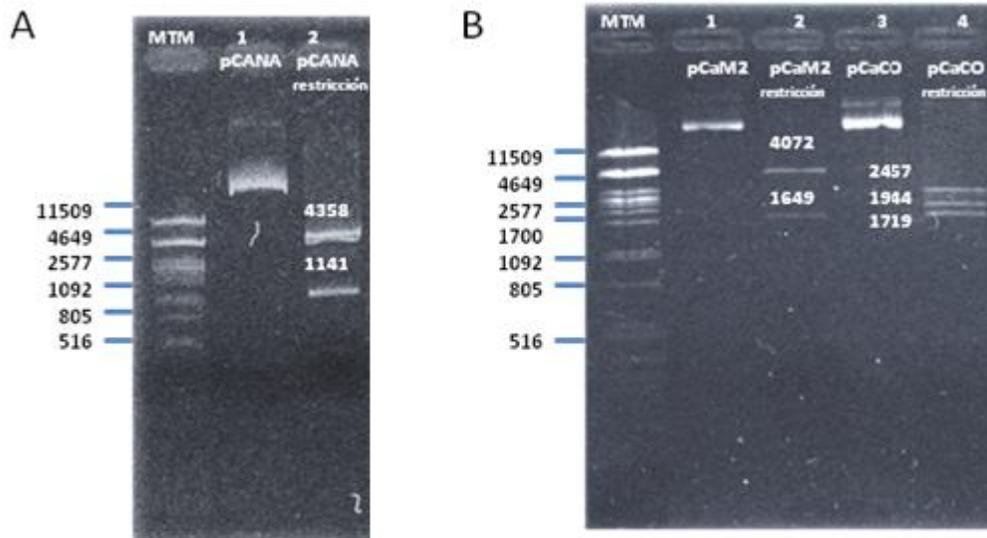
Dado que la relación de absorbancias a 260 y 280 nm de los plásmidos recuperados se encontró en el rango de 1.8 a 2, podemos señalar que el DNA plasmídico tuvo una pureza adecuada para emplearlo en ensayos posteriores, es decir no contuvo proteínas ni sales que interfirieran en la transfección a células 293T. Adicionalmente, se verificó la identidad y calidad del DNA plasmídico por medio de reacciones de restricción enzimática y electroforesis en gel de agarosa. Las enzimas de restricción se seleccionaron utilizando la herramienta NEBcutter V2.0 de la Base de Datos de Enzimas de Restricción (URL<sup>2</sup>) (Tabla 4) y se comparó con el patrón electroforético (Figuras 13 y 14).

**Tabla 4.** Enzimas de restricción seleccionadas y el tamaño de los fragmentos esperados.

Plásmido	Tamaño de plásmido (pb)	Enzimas seleccionadas (número de cortes)	Fragmentos esperados(pb)
pHAT	6048	EcoRI (2), HindIII (1)	4234, 1192, 622
pMLV	9152	HindIII (3)	4956, 3946, 250
pGal	9922	EcoRV (3), HindIII (2)	4356, 2190, 2185, 1116, 75
pCaCo	6120	PstI (2), SmaI (1)	2457, 1944, 1719
pCaNA	5836	BamHI (2), PstI (1)	4358, 1141, 310
pCaM2	5721	PstI (2)	4072, 1649



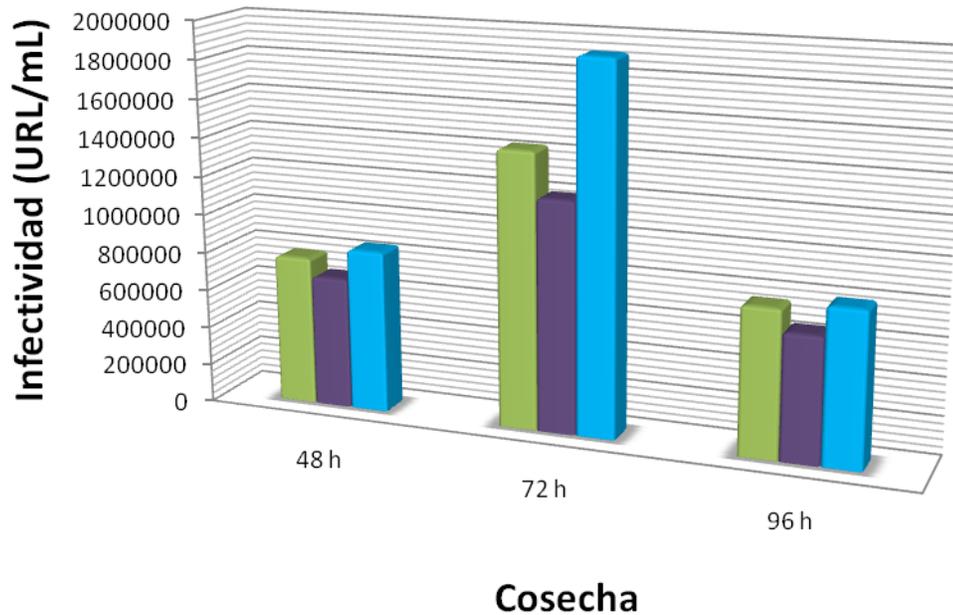
**Figura 13. Mapeo de restricción de los plásmidos pMLV, pHAT y pGal.** El DNA plasmídico recuperado de maxipreparaciones se digirió con las enzimas seleccionadas a través de un análisis bioinformático (Tabla 5). A) Se muestran los plásmidos pMLV, pHAT (carriles 1, 3) y sus productos de digestión (carriles 2 y 4). B) El carril 1 es el plásmido pGal sin restringir, en el carril 2 se presentan sus productos de digestión. El tamaño de las bandas se determinó con base en el marcador de tamaño molecular  $\lambda$ DNA digerido PstI.



**Figura 14. Mapeo de restricción de los plásmidos pCaNA, pM2 y pCaCo.** El DNA plasmídico recuperado de maxipreparaciones se digirió con las enzimas seleccionadas a través de un análisis bioinformático (Tabla 5). A) Se muestra el plásmido pCaNA (carril 1) y sus productos de digestión (carril 2). B) Los carriles 1 y 3 son los plásmidos pCaM2 y pCaCO sin restringir; y los carriles 2 y 4 son sus productos de digestión. El tamaño de las bandas se determinó con base en el marcador de tamaño molecular  $\lambda$ DNA digerido PstI.

Las bandas observadas en los electroferogramas de las figuras 13 y 14 coinciden al tamaño de los fragmentos esperados según el análisis informático (Tabla 4), con ello se corroboró la identidad de cada plásmido. La forma molecular I (súper enrollada) fue predominante en los plásmidos extraídos, por lo tanto los plásmidos recuperados tuvieron una calidad adecuada para continuar con la transfección a células 293T.

Una vez transfectadas las células 293T, se recuperaron los pseudotipos cosechando el sobrenadante a las 48, 72 y 96 h post-transfección. Se produjeron pseudotipos retrovirales que presentan en su superficie la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 y portan, como gen reportero, el gen que codifica a la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Para probar la infectividad de los pseudotipos, se determinaron las Unidades Relativas de Luminiscencia por mililitro (URL/mL) que resultan al infectar con ellos células 293T (Figura 15).



**Figura 15. Cuantificación de pseudotipos cosechados a las 48, 72 y 96 h post-transfección.** Se muestran los valores obtenidos de luminiscencia (URL/mL) al infectar células 293T con los pseudotipos retrovirales cosechados. Los colores empleados corresponden a tres lotes de producción diferentes.

Al comparar los valores de quimioluminiscencia, se observa que éstos son variables entre las tres cosechas realizadas; los mayores valores de señal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se obtuvieron con los pseudotipos retrovirales recuperados a las 72 h. A pesar de la variación, los resultados de infectividad son adecuados para tener suficiente cantidad para emplearlos en ensayos de microneutralización. Se calculó, para cada lote y cosecha, la dilución de los pseudotipos retrovirales requerida para manejar 10000 URL en los ensayos de microneutralización. Para la etapa de escrutinio, los sueros se analizaron al azar, por duplicado y en ciego, a una dilución final de 1:40 con el fin descartar aquellos que presentaran una neutralización menor al <50%, los cuales se consideraron como negativos. Aquellos sueros que tuvieron un porcentaje de neutralización  $\geq 50\%$  se consideraron positivos y algunos de éstos se analizaron en la segunda fase mediante la realización de curvas de titulación, para determinar el título de NAb y factores que puedan favorecer el aumento en la generación de NAb. De esta primera etapa se analizaron los resultados para determinar la seroprevalencia en los trabajadores del IMSS.

En total obtuvimos un 26.71% de trabajadores de la salud con resultado positivo en la primera etapa de eliminación de muestras negativas; para el grupo de control se encontró un 20% de positivos. La diferencia entre la seroprevalencia en los trabajadores y la población en general no fue significativa ( $p = 0.872$ ). Sin embargo, se desglosaron los resultados para analizar si se presentaron factores que pudieron favorecer a contraer el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 en los trabajadores de la salud (Tablas 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11):

**Tabla 5.** Comparación de la proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por sexo, edad y centro de trabajo.

	Resultado				Valor p
	Positivo		Negativo		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
<b>Sexo</b>					
Masculino	146	27.1	392	72.9	0.788
Femenino	298	26.5	826	73.5	
<b>Edad**</b>					
18-34 años	101	24.9	305	75.1	0.815
35-42 años	104	27.6	273	72.4	
43-48 años	106	26.4	295	73.6	
>49 años	115	27.4	305	72.6	
<b>Centro de Trabajo</b>					
HECMNSXXI	11	8.1	124	91.9	<0.001*
HPCMNSXXI	42	37.5	70	62.5	
HGCMN LA RAZA	133	33.2	267	66.8	
HECMN LA RAZA	19	18.4	84	81.6	
HICMN LA RAZA	32	30.2	74	69.8	
HGO No 3 LA RAZA	36	23.8	115	76.2	
HGO No 3 A MAGDALENA	35	29.2	85	70.8	
HTRAUMA MAGDALENA	25	24.0	79	76.0	
HGO/UMF 13	21	21.0	79	79.0	
HG2/UMF 26	6	6.7	84	93.3	
UMF-57	34	35.8	61	64.2	
SNTSS	5	50.0	5	50.0	
CVE. COORD. VIG. EPID.	32	44.4	40	55.6	
C.E. CENTRO MED. LA RAZA	12	21.8	43	78.2	
SALUD EN EL TRABAJO	1	11.1	8	88.9	

n = 1676

\*Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

\*\* Los grupos se dividieron con base en los percentiles por edad, generando subgrupos cada 25%.

De la tabla 5 puede observarse que no se encontró diferencia significativa entre los porcentajes de muestras positivas obtenidas en hombres y mujeres. Las seropositividad por edades tampoco presentó diferencia significativa a pesar de los rangos determinados por percentiles para

homogeneizar el número de muestras incluidas en cada rango, por lo que se compararon las edades entre grupos encontrando que se formaron grupos homogéneos de edades tanto por sexo como por centro de trabajo ( $p=0.991$  y  $0.992$ , respectivamente). Como se puede apreciar en la tabla 5, sí hubo diferencia importante estadísticamente en el porcentaje de positivos por centro de trabajo, por lo que este factor se analizó para estimar el riesgo del trabajador con base en el lugar de trabajo, por medio del cálculo de la razón de momios (Tabla 6):

**Tabla 6.** Análisis del riesgo de los trabajadores para seroconvertir contra la influenza A(H1N1)pdm09, asociado a centro de trabajo.

Variable	Razón de momios (OR)	IC95%	Valor p
<b>Centro de Trabajo</b>			
HECMNSXXI	0.224	0.108-0.421	>0.001*
HPCMNSXXI	1.713	1.120-2.594	0.007*
HGCMN LA RAZA	1.523	1.182-1.957	>0.001*
HECMN LA RAZA	<b>0.604</b>	<b>0.342-1.017</b>	<b>0.050*</b>
HICMN LA RAZA	<b>1.201</b>	<b>0.755-1.873</b>	0.403
HGO No 3 LA RAZA	<b>0.846</b>	<b>0.555-1.264</b>	0.403
HGO No 3 A MAGDALENA	<b>1.141</b>	<b>0.734-1.741</b>	0.529
HTRAUMA MAGDALENA	<b>0.860</b>	<b>0.518-1.386</b>	0.524
HGO/UMF 13	<b>0.716</b>	<b>0.415-1.188</b>	0.183
HG2/UMF 26	0.185	0.065-0.424	>0.001*
UMF-57	<b>1.573</b>	<b>0.986-2.472</b>	<b>0.039*</b>
CVE. COORD. VIG. EPID.	<b>2.287</b>	<b>1.370-3.787</b>	>0.001*
C.E. CENTRO MED. LA RAZA	<b>0.759</b>	<b>0.361-1.482</b>	0.404

\*Diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ).

Los valores señalados en rojo, indican que no el resultado de OR no reveló un mayor o menor riesgo con base en el IC95%.

No se calculó la OR para el Sindicato de Trabajadores del Seguro Social (SNTSS), ni para el centro de Salud en el trabajo debido al bajo número de muestras ( $n=10$  y  $9$ , respectivamente).

De los centros que presentaron una estimación de riesgo significativa, el personal del Hospital General de Zona No.2/Unidad Médica Familiar 26 (HG2/UMF26) exhibió un menor riesgo en adquirir la influenza pandémica. Por el contrario, el Hospital Pediátrico del Centro Médico Nacional Siglo XXI (HPCMNSXXI) presentó una mayor probabilidad de presentar algún caso positivo en esta institución en comparación con los otros organismos, seguido del Hospital General Centro Médico Nacional La Raza.

Ya que se presentó una diferencia significativa por centro de trabajo, se examinó si el puesto, turno, medio de transporte utilizado o disponer de un segundo empleo pueden ser una variable de riesgo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Comparación de la proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por puesto de trabajo, turno y medio de transporte utilizado.

	Resultado				Valor p
	Positivo		Negativo		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
<b>Puesto de Trabajo</b>					
Servicios básicos <sup>a</sup>	127	27.9	328	72.1	0.276
Enfermería y otros <sup>b</sup>	173	24.7	528	75.3	
Médico <sup>c</sup>	143	28.4	360	71.6	
<b>Turno</b>					
Matutino	324	26.3	908	73.7	0.598
Vespertino	47	28.8	116	71.2	
Nocturno	41	29.5	98	70.5	
Jornadas acumuladas	4	57.1	3	42.9	
Mixto	21	23.1	70	76.9	
Rotativo	4	22.2	14	77.8	
Guardias ABC	3	27.3	8	72.7	
No Especificado	0	0.0	1	100.0	
<b>Transporte</b>					
Auto	130	28.3	329	71.7	0.379
Taxi	24	35.8	43	64.2	
Metro	17	19.5	70	80.5	
Metrobus	4	30.8	9	69.2	
Combi	45	27.3	120	72.7	
Otro	18	29.5	43	70.5	
<b>Segundo empleo</b>					
Si	27	24.5	83	75.5	0.627
No	397	26.7	1092	73.3	
<b>Categoría de segundo empleo</b>					
Servicio Básico	4	36.4	7	63.6	0.199
Enfermería y otros	2	10.0	18	90.0	
Médico	19	26.0	54	74.0	

<sup>a</sup> Auxiliar de oficinas, trabajador de intendencia y otros.

<sup>b</sup> Asistente médico, auxiliar de enfermería, enfermera, fisioterapeuta, jefe o subjefa de enfermeras, jefatura de enfermería, laboratorista, nutrición y técnico de rayos X.

<sup>c</sup> Anestesiólogo, médico familiar, médico interno de pregrado, médico no familiar, residente, cirujano y odontólogo.

Los trabajadores de la salud reclutados provenían de diferentes áreas que se agruparon en tres categorías: Servicios básicos, enfermería y otros y médicos; con ello se pretendió dividir de menor a mayor riesgo, con base en la exposición con personas infectadas. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en cuanto a puesto laboral; aunque, como se esperaba según la división, el mayor porcentaje de positivos se presentó en el grupo de médicos. Además, se examinó el efecto del turno laboral; aquellos que tenían turnos con jornadas acumuladas tuvieron mayor frecuencia de positivos, seguido de trabajadores de turno nocturno, pero el número de participantes no influyó en generar

una diferencia significativa. Los trabajadores de la salud con un segundo empleo tampoco tienen un mayor riesgo de contraer la enfermedad, sin importar la categoría de este segundo empleo. Adicionalmente se comparó la seroprevalencia en los trabajadores de la salud con base en el medio de transporte usado para llegar a sus centros de trabajo, porque se esperaba que usuarios de transporte público se expusieran más al agente infeccioso. Como se observa en la tabla 7 no hubo diferencia significativa en los resultados.

Se consideró que un aspecto que pudo facilitar el contagio fue el contacto con personas con o sospechosos de padecer influenza A(H1N1)pdm09, para ello se analizó si el número de casos con los cuales tuvo contacto el trabajador o la cercanía con la persona infectada podrían favorecer a la transmisión del virus (Tabla 8).

**Tabla 8.** Comparación de la proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por contacto con posibles personas infectadas.

	Resultado				Valor p
	Positivo		Negativo		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
<b>Contacto, en su empleo, con caso de influenza A(H1N1)pdm09 o sospechoso</b>					
Si	262	28.1	672	71.9	0.127
No	163	24.6	499	75.4	
<b>Número de personas con sospecha o confirmación de influenza A(H1N1)pdm09 con quien tuvo contacto</b>					
0	195	24.9	589	75.1	0.031*
1-5	130	25.7	376	74.3	
>5	119	32.0	253	68.0	
<b>Contacto con caso de influenza A(H1N1)pdm09 o sospechoso en el segundo empleo</b>					
Si	15	25.9	43	74.1	0.927
No	12	26.7	33	73.3	
<b>Contacto con familiar con influenza A(H1N1)pdm09 o sospechoso</b>					
Esposo(a)	7	35.0	13	65.0	0.158
Hijo	17	30.9	38	69.1	
Padres	2	13.3	13	86.7	
Hermanos	11	45.8	13	54.2	
Otros	45	29.4	108	70.6	
Ninguno	320	25.9	913	74.1	

**Continuación de la tabla 8.** Comparación de la proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por contacto con posibles personas infectadas.

	Resultado				Valor p
	Positivo		Negativo		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
<b>Contacto en la comunidad con caso con influenza A(H1N1)pdm09 o sospechoso</b>					
Vecinos de edificio	2	66.7	1	33.3	
Vecino de la calle	6	24.0	19	76.0	
Vecinos de la colonia	5	19.2	21	80.8	
Escuela	4	66.7	2	33.3	
Compañeros de trabajo	64	26.9	174	73.1	
Ninguno	307	26.1	868	73.9	0.138

\*Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Los resultados de la tabla 8 señalan que la cercanía con personas infectadas no representa un riesgo en contraer la enfermedad, sin embargo el número de personas infectadas con las que estuvo en contacto el trabajador si aumentó significativamente el porcentaje de positivos en el grupo de estudio. Debido a que el número de contactos con o sospechosos de influenza A(H1N1)pdm09 evidenció un aumento en la seropositividad, y pueda ser el factor que explique el 6.71% de aumento en la seroprevalencia en los trabajadores en comparación al grupo control, se compararon algunas medidas de protección en la tabla 9.

**Tabla 9.** Comparación de la proporción de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 con base en las medidas de protección reportadas.

	Resultado				Valor p
	Positivo		Negativo		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
<b>Utilizó equipo de protección personal</b>					
Si	225	27.5	592	72.5	0.285
No	25	33.3	50	66.7	
<b>Tipo de equipo de protección personal</b>					
Mascarilla quirúrgica o tapabocas	223	27.8	578	72.2	0.260
Goggles	0	0.0	4	100.0	
Bata o delantal	0	0.0	3	100.0	
<b>Uso de equipo de protección antes de iniciada la pandemia de influenza A (H1N1) 2009</b>					
Habitual	174	25.3	514	74.7	0.130
Frecuente	72	25.4	212	74.6	
Poco frecuente	78	33.2	157	66.8	
Nunca	80	24.5	246	75.5	
<b>Utilizó equipo de protección personal en el segundo empleo</b>					
Si	17	29.8	40	70.2	0.117
No	0	0.0	6	100.0	
<b>Vacunación contra influenza estacional, vacuna del periodo invierno 2007-2008***</b>					
Si	88	23.0	294	77.0	0.064
No	356	27.8	924	72.2	
<b>Recibió antivirales para prevenir influenza estacional o A(H1N1)pdm09**</b>					
Si	52	35.4	95	64.6	<b>0.011*</b>
No	365	25.6	1061	74.4	

\*Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

\*\*El tratamiento que mencionaron recibir fue Tamiflu, Zanamivir u Oseltamivir.

\*\*\* La vacuna administrada contenía las cepas vacunales A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2) y B/Florida/4/2006.

La variación en los porcentajes de trabajadores que recurrieron al uso de equipo de protección durante la pandemia, no fue significativo sin importar el tipo de indumentaria empleada. De la tabla 9 es imperativo recalcar que no se presentó cruce antigénico debido a la vacunación contra la influenza estacional, pues la variación no influyó el aumento significativo de la seropositividad. Sorpresivamente en los trabajadores que recibieron antivirales para prevenir la influenza aumentó significativamente el porcentaje de positivos. Dado el resultado contradictorio sobre tratamiento antiviral, se analizó la base de datos, encontrando que muchos de los trabajadores que recibieron medicamento reportaron haber presentado algún síntoma relacionado con influenza, lo que podría

indicar que la administración de medicamento no fue como medida profiláctica, sino como tratamiento. Se procedió a determinar el riesgo atribuido por el uso de antivirales, así como el número de personas infectadas con quienes estuvo en contacto el trabajador (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis del riesgo de los trabajadores para seroconvertir contra la influenza A(H1N1)pdm09, asociado a número de contactos con influenza y uso de antivirales.

Variable	Razón de momios	IC95%	Valor p
<b>Número de personas con sospecha o confirmación de influenza A(H1N1)pdm09 con quien tuvo contacto</b>			
0			
1-5	<b>1.044</b>	<b>0.800-1.360</b>	0.741
>5	1.396	1.075-1.807	<b>0.009*</b>
<b>Recibió antivirales para prevenir la influenza estacional o A(H1N1)pdm09</b>			
No	1.591	1.089-2.305	<b>0.010*</b>
Si			

\*Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

El valor señalado en rojo, indican que el resultado de OR no reveló un mayor o menor riesgo con base en el IC95%.

Aquellos trabajadores que estuvieron en contacto con más de cinco personas infectadas presentaron un mayor riesgo de exponerse con el virus de la influenza A(H1N1)pdm09. Por otro lado, los trabajadores que recibieron antivirales aumentaron su riesgo a adquirir la infección, lo que también nos señala que este factor no se empleó como medida para prevenir la influenza A(H1N1)pdm09 ya que los tres antivirales mencionados en las encuestas son inhibidores de la NA del virus de la influenza, y por consiguiente se emplean como tratamiento contra virus de la influenza tipo A y B (Lackenby *et al.*, 2008). Conjuntamente se investigó la frecuencia de síntomas y casos reportados de influenza estacional o pandémica (Tabla 11).

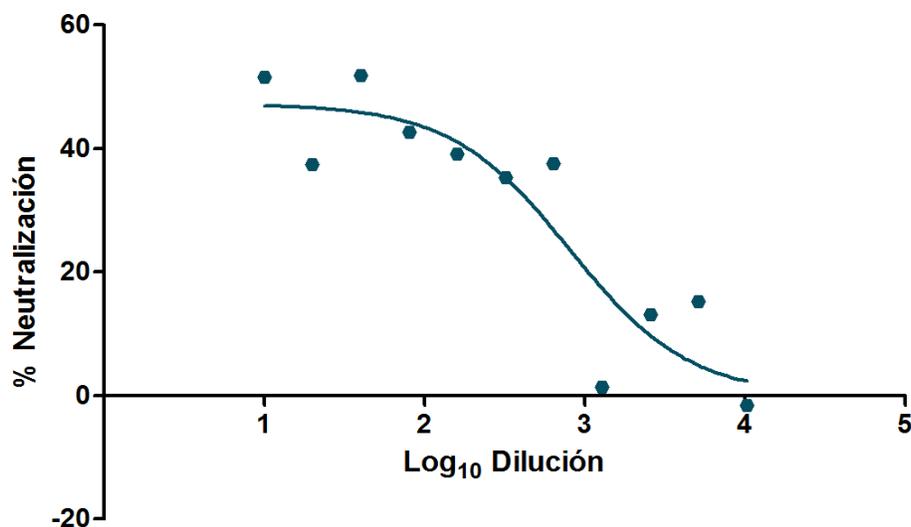
**Tabla 11.** Resultados de positivos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 obtenidos comparando presencia de síntomas, adquisición o confirmación de influenza.

	Resultado				Valor p
	Positivo		Negativo		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
<b>Presentó síntomas de enfermedad respiratoria*</b>					
Fiebre					
Cefalea	81	27.9	209	72.1	0.479
Tos	134	26.9	365	73.1	0.797
Dolor de garganta	155	26.2	436	73.8	0.925
Rinorrea	185	26.5	512	73.5	0.903
Dolor muscular	145	25.9	414	74.1	0.742
	87	23.1	289	76.9	0.093
<b>Enfermó por influenza estacional</b>					
Si	40	24.2	125	75.8	
No	369	26.7	1012	73.3	0.495
<b>Confirmación de influenza estacional</b>					
Si	2	15.4	11	84.6	
No	412	26.6	1138	73.4	0.362
<b>Enfermó por influenza A(H1N1)pdm09</b>					
Si	3	15.0	17	85.0	
No	408	26.6	1125	73.4	0.242
<b>Confirmación de influenza A(H1N1)pdm09</b>					
Si	1	9.1	10	90.9	
No	410	26.6	1132	73.4	0.190

\*La comparación se realizó entre los que presentaron o no cada uno de los síntomas.

Ninguno de los síntomas especificados en el cuestionario se relacionó con incremento en la seropositividad. Tampoco se observó diferencia significativa cuando el trabajador reportó si enfermó con influenza A(H1N1)pdm09 o influenza estacional, o si la enfermedad fue confirmada. Pese a que gran parte de los casos confirmados de influenza A(H1N1)pdm09 no se detectaron en la primera etapa, es fundamental señalar que se desconoce el tipo de métodos de diagnóstico utilizado para la confirmación; algunos de ellos, como el ensayo rápido de influenza, únicamente permiten discriminar entre virus de influenza A o B sin especificar subtipo. La principal razón por la cual se anexó el resultado de confirmación de casos fue para enfatizar que muy pocos trabajadores de la salud participantes se realizaron pruebas de diagnóstico en caso de haber presentado síntomas.

Algunos de los sueros que resultaron positivos en la primera etapa se examinaron para precisar el título de anticuerpos. Para determinar la dilución de suero a la cual se obtiene el 50% de neutralización ( $ED_{50}$ ), se graficó el  $\text{Log}_{10}$  de la dilución de suero contra el porcentaje de neutralización calculado (Figura 16). El valor  $ED_{50}$  fue calculado ajustando los resultados de neutralización a una curva sigmoidea mediante un análisis por 4PL.



**Figura 16. Curva de neutralización de suero problema para el cálculo del título de NAbs.** Ejemplo de la determinación del título de anticuerpos neutralizantes presentes en las muestras separadas a partir de la primera etapa. En este caso la  $ED_{50}$  se obtuvo a la dilución 1:810.4, con una  $R^2=0.8204$ .

De los sueros procedentes de los trabajadores del IMSS a los cuales se les realizaron curvas de neutralización, 48 presentaron títulos  $\geq 40$ , teniendo un rango de valores de  $\geq 40$  a  $\leq 10240$ . Por lo cual, se examinaron diferentes factores que pueden estar relacionados con el aumento del título de anticuerpos en estas muestras con títulos  $\geq 40$  (Tablas 12 y 13).

**Tabla 12.** Comparación de los títulos de NAbs (GTM) contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 obtenidos por edad, centro de trabajo, puesto y turno.

	Número	GTM (IC95%)	Desviación Estándar	Valor p
<b>Sexo</b>				
Masculino	15	380.2	4.3	0.144
Femenino	33	758.6	4.6	
<b>Edad</b>				
18-34 años	9	851.1	6.0	0.598
35-42 años	10	467.7	5.6	
43-48 años	11	831.7	4.7	
>49 años	16	616.6	3.5	
<b>Centro de Trabajo</b>				
HPCMNSXXI	2	501.2	8.5	0.981
HGCMN LA RAZA	10	251.2	4.6	
HECMN LA RAZA	1	316.2	----	
HICMN LA RAZA	5	1096.5	3.5	
HGO No 3 LA RAZA	6	436.5	7.1	
HGO No 3 A MAGDALENA	5	380.2	5.4	
HTRAUMA MAGDALENA	1	204.2	----	
HGO/UMF 13	3	2089.3	3.9	
HG2/UMF 26	2	3090.3	3.5	
UMF-57	7	1148.2	2.8	
SNTSS	3	467.7	4.3	
CVE. COORD. VIG. EPID.	3	1174.9	3.6	
<b>Puesto de Trabajo</b>				
Servicios básicos <sup>a</sup>	16	776.2	4.3	0.727
Enfermería y otros <sup>b</sup>	14	380.2	4.0	
Médico <sup>c</sup>	18	724.4	5.4	
<b>Turno</b>				
Matutino	36	812.8	3.8	0.073
Vespertino	3	72.4	1.7	
Nocturno	6	195.0	2.0	
Mixto	2	776.2	28.2	
Guardias ABC	1	10000	----	

<sup>a</sup> Auxiliar de oficinas, trabajador de intendencia y otros.

<sup>b</sup> Asistente médico, auxiliar de enfermería, enfermera, fisioterapeuta, jefe o subjefa de enfermeras, jefatura de enfermería, laboratorista, nutrición y técnico de rayos X.

Aunque las mujeres presentaron en promedio un mayor título de anticuerpos que los hombres, la diferencia de ambos géneros no fue significativa (758 vs 380,  $p=0.144$ ). Tampoco varió significativamente el título de NAbs con base a la edad, centro de trabajo, puesto y turno. Debido a que ningún factor correspondiente a características del trabajador tuvo un efecto en el aumento de NAbs, se analizó la GTM relacionada con contacto con personas infectadas y medidas de protección del trabajador (Tabla 13).

**Tabla 13.** Comparación de los títulos de NAbs obtenidos por contacto con posibles personas infectadas y formas de protección utilizadas por el trabajador para evitar el contagio con influenza A(H1N1)pdm09.

	Número	GTM (IC95%)	Desviación Estándar	Valor p
<b>Contacto, en su empleo, con caso de influenza A(H1N1)pdm09 o sospechoso</b>				
Si	30	588.8	4.1	
No	16	831.8	5.4	0.468
<b>Número de personas con sospecha o confirmación de influenza A(H1N1)pdm09 con quien tuvo contacto</b>				
0	18	645.7	5.6	
1-5	13	467.7	4.4	
>5	17	707.95	4.0	0.659
<b>Segundo empleo</b>				
Si	2	1148.2	13.8	
No	43	645.7	4.7	0.614
<b>Utilizó equipo de protección personal</b>				
Si	26	602.6	4.6	
No	3	562.3	1.7	0.948
<b>Vacunación contra influenza estacional</b>				
Si	40	691.8	4.8	
No	8	331.1	3.5	0.212
<b>Recibió antivirales para prevenir influenza A (H1N1)</b>				
Si	4	616.6	9.3	
No	40	660.7	4.5	0.925
<b>Enfermó por influenza estacional</b>				
Si	7	1096.5	2.9	
No	37	616.6	5.0	0.376

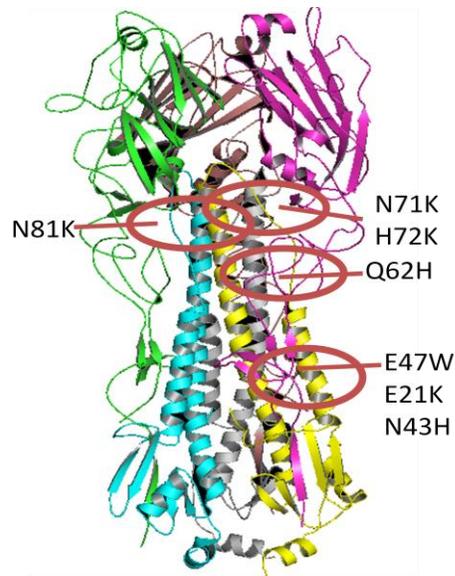
Al igual que en la tabla 12, las variables de la tabla 13 no puntualizaron factores que potencien el título de NAbs contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09. Es importante recordar, que se utilizaron para este análisis estadístico sólo un pequeño grupo de sueros con títulos de NAbs  $\geq 40$ , por ello es probable que el número de muestras analizadas limitó la búsqueda de factores que contribuyan al aumento de la respuesta mediada por NAbs.

## II. Análisis Bioinformático.

Se identificaron siete mutaciones en la región del tallo que posiblemente favorezcan al aumento de la estabilidad de la HA, ya que se localizan en una posición adecuada para generar nuevas interacciones con aminoácidos presentes en los otros monómeros. Las mutaciones seleccionadas se muestran en la estructura de la HA con clave en el PDB:3M6S (Figura 17).

Mutación	Cadena
N71K	B, D y F
E47W	B, D y F
E21K	A, C y E
H72K	B, D y F
N81H	B, D y F
N43H	B, D y F
Q62H	B, D y F

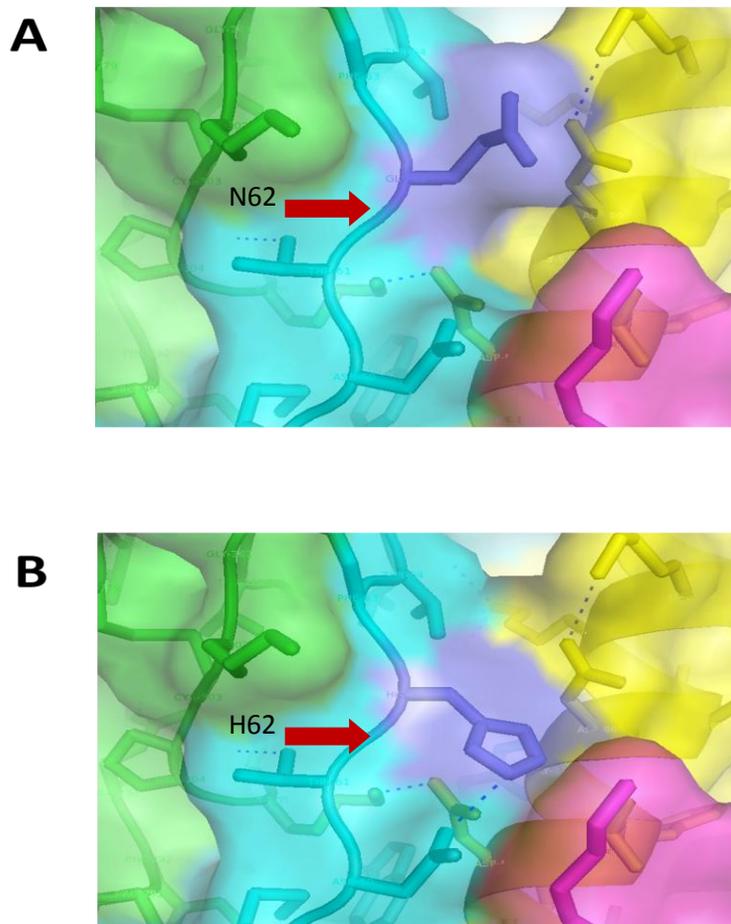
\*Las posiciones se determinaron con base en la estructura PDB: 3M6S.



**Figura 17. Posiciones de las mutaciones predichas en las estructuras de la HA 3M6S y 3LZG.** Las mutaciones seleccionadas se localizaron en la HA PDB:3M6S, se muestra en el cuadro la posición de las mismas por cadena, recordando que las mutaciones se introdujeron en los tres monómeros que forman la HA viral.

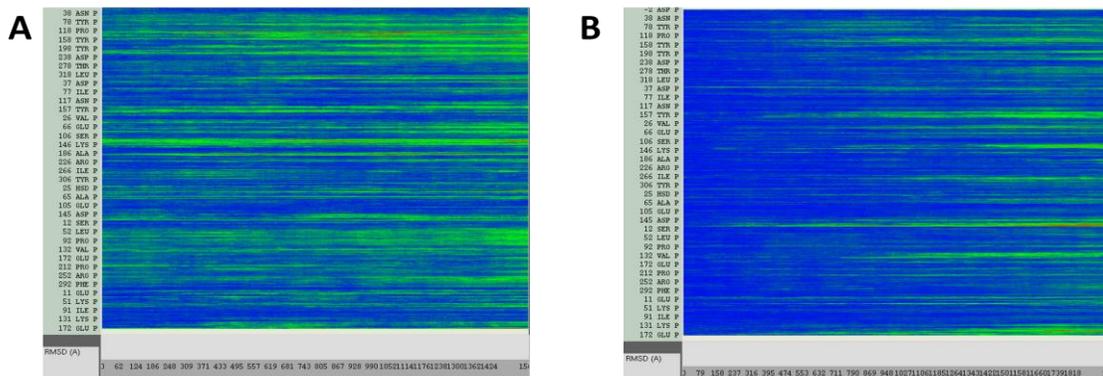
Es importante señalar que ninguna de las sustituciones estudiadas se presenta en el sitio de reconocimiento al receptor, en los sitios de reconocimiento de anticuerpos, ni en el péptido de fusión; por lo cual se espera que estas mutaciones mejoren la estabilidad de la HA, sin comprometer las funciones de la proteína ni su antigenicidad.

La figura 18 es un ejemplo de la búsqueda realizada en la estructura para seleccionar sustituciones de aminoácidos cercanos a otros residuos, con los cuales podrían formar nuevas interacciones.

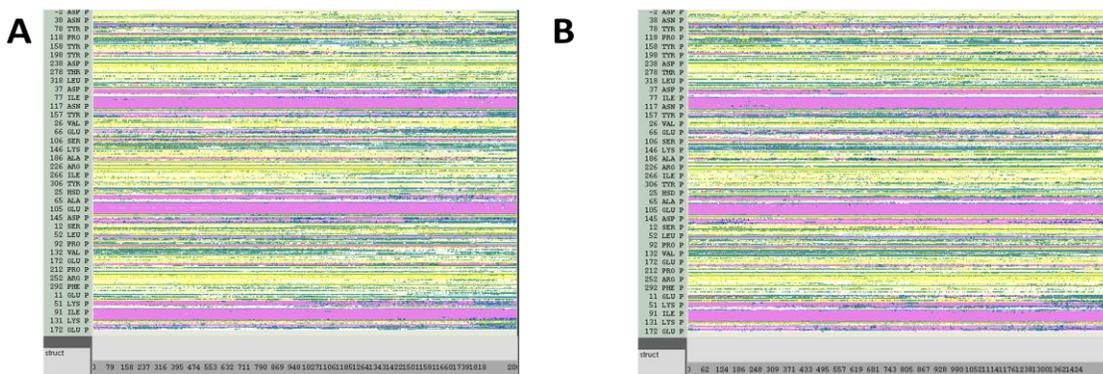


**Figura 18. Ejemplo de la selección de mutaciones capaces de formar nuevas interacciones.** Se buscaron las sustituciones de aminoácidos, determinadas a partir de los alineamientos múltiples, en la estructura de la HA; se verificó que se encontraran residuos con los cuales podría interactuar el nuevo aminoácido. La línea punteada representa interacciones polares. A) En color azul oscuro se muestra el aminoácido asparagina presente en la estructura HA silvestre PDB:3M6S. B) Mutación N62H (asparagina por histidina) realizada en la estructura de la HA (color azul oscuro).

Las primeras simulaciones que se realizaron fueron de 2 ns a 600K con el programa NAMD 1.8.7 para dilucidar, a alta temperatura, si las mutaciones podrían o no ser capaces de estabilizar a la proteína a condiciones extremas. Se analizó la movilidad de los residuos y el comportamiento de las estructuras secundarias durante el tiempo de simulación, creando gráficas del RMSD por residuo y de estructuras secundarias (Figuras 19 y 20):



**Figura 19. Gráficas del RMSD por residuo a 600 K.** Representaciones de la movilidad de los residuos basándose en una estructura inicial. A) HA silvestre, B) HA mutada. El color azul indica menor movimiento, por lo tanto mayor rigidez.



**Figura 20. Evolución de las estructuras secundarias a 600K.** Se muestra el comportamiento de las estructuras secundarias al aumentar la temperatura. A) HA silvestre, B) HA mutada. El color verde señala giros, el color amarillo representa  $\beta$ -plegamientos, el color azul  $\pi$ -hélices, y el color rosa  $\alpha$ -hélices.

Al comparar las gráficas de la figura 19, se observa la reducción global de los valores de RMSD (desviación de la raíz cuadrática de la media), debido a las mutaciones. Lo anterior se evidencia gracias al código de colores empleado, donde a los valores menores del RMSD les corresponde un color azul y estos resultados representan un menor movimiento de los residuos y, por consecuencia, la estabilización de la HA. Con respecto a las gráficas de estructuras secundarias (Figura 20), la HA mutada presentó un diferente comportamiento durante la simulación. Dado que se presentaron resultados globales del comportamiento de las estructuras secundarias, las diferencias en las gráficas son apreciativas. En las representaciones de la figura 19, no se puede diferenciar con claridad la variación en el mantenimiento de estructuras secundarias; posiblemente la desnaturalización

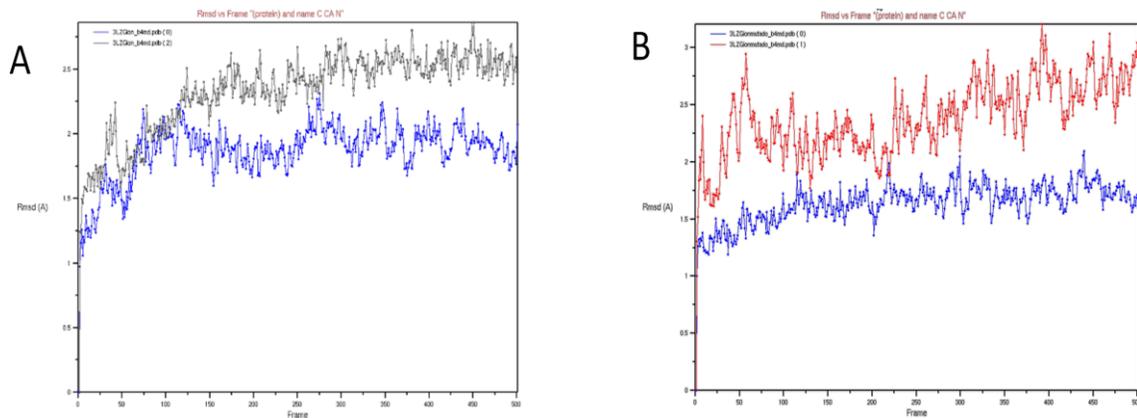
generada por la temperatura de 600 K dificulta obtener patrones característicos del comportamiento. Para corroborar los resultados se prosiguió a realizar las simulaciones a 300 y 400 K; en estas últimas simulaciones se utilizó como modelo la proteína 3LZG, porque contiene en la estructura un residuo de ácido siálico del receptor celular y el programa Gromacs 3.3.1 permite analizar sistemas que contengan algunos carbohidratos.

Para todas las simulaciones se calculó el valor de RMSD global, con la herramienta RMSD Trajectory Tool del programa VMD 1.8.7. Estos valores señalan en promedio la variación estructural conforme avanza el tiempo de simulación, calculada con base en el alineamiento con las estructuras iniciales (Tabla 14).

**Tabla 14.** Valores del RMSD de la HA silvestre y mutada a 300, 400 y 600K.

Temperatura	Valor de RMSD, HA silvestre	Valor de RMSD, HA mutada
300 K	1.863	1.635
400 K	2.325	2.379
600 K	4.654	4.498

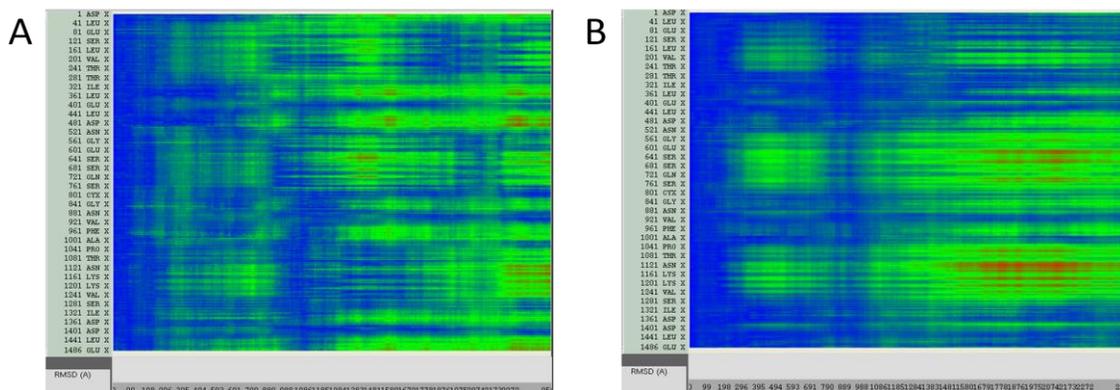
Un menor valor en el RMSD significa una menor fluctuación de los residuos de la proteína, así a 300 K la HA mutada parece tener una mayor rigidez que la HA silvestre a la misma temperatura. Sin embargo, la HA silvestre presentó menor movilidad a 400 K comparada con la HA mutada; pero a 600 K disminuye la fluctuación de los residuos en la estructura mutada. Como se muestra en la tabla 14, conforme aumenta la temperatura las proteínas se van desnaturalizando, por ello el aumento de los valores de RMSD con respecto a la temperatura es una tendencia esperada. Debido a que se aumentó el tiempo de simulación para las estructuras a 300 y 400 K hasta 5 ns, se obtuvo la gráfica de RMSD global (RMSD Trajectory Tool) con el fin de visualizar si se estabilizaron los sistemas o si era necesario extender el tiempo de simulación (Figura 21).



**Figura 21. Gráficas del RMSD global de las simulaciones realizadas.** A) RMSD de la HA silvestre a 300 K (azul) y 400 K (gris), B) RMSD de la HA mutada a 300 K (azul) y 400 K (rojo).

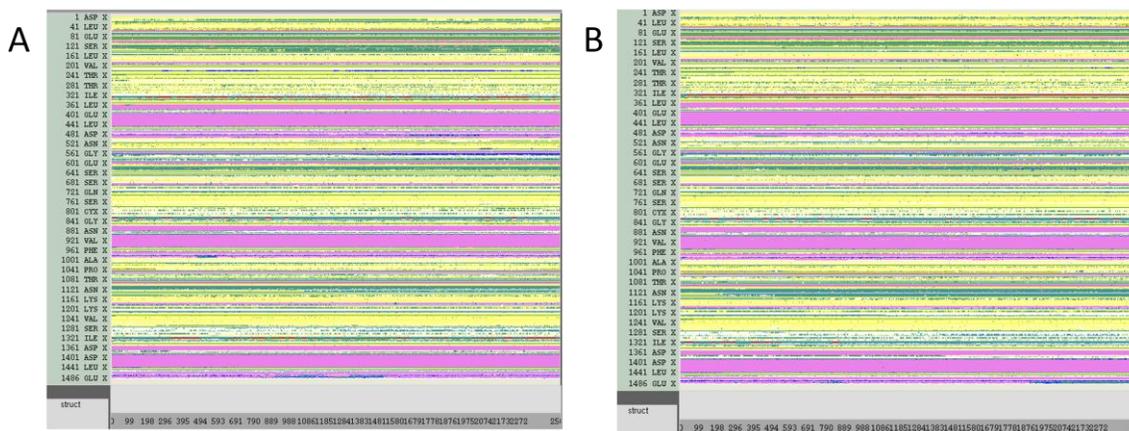
Las gráficas de la figura 21 señalan el marco (*frame*) en el que se estabilizan las estructuras durante la simulación, es decir que se genera una tendencia en la gráfica del RMSD, reduciendo la variación en los picos de la misma. La HA silvestre se estabiliza a los 2.5 ns (marco 250) a 300 K, a los 2 ns (marco 200) la HA mutada a 300 K; se observa en las gráficas que para la proteína HA mutada (Figura 21B color rojo) no se alcanzó la estabilización del sistema a 400 K, por ello se procedió a extender el tiempo de las simulaciones a 400 K hasta 10 ns.

Se analizaron las gráficas del RMSD por residuo, de estructuras secundarias y se obtuvieron estructuras de las HAs coloreadas según el valor RMSD, usando la herramienta de VMDICE, de la HA silvestre y mutada a 300 K (Figuras 22, 23 y 24).



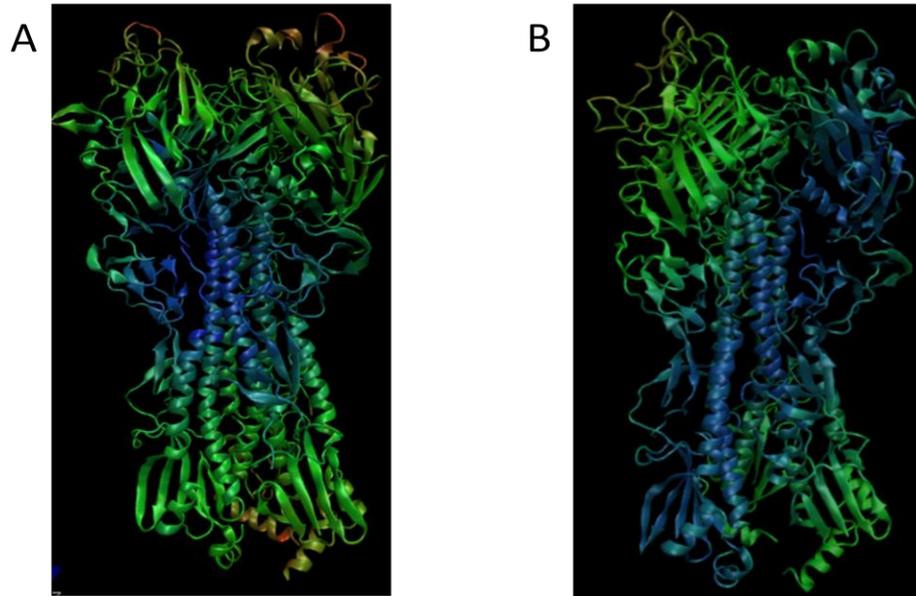
**Figura 22. Gráficas del RMSD por residuo a 300 K.** Representaciones de la movilidad de los residuos basándose en una estructura inicial. A) HA silvestre a 300 K, B) HA mutada a 300 K. El color azul indica menor movimiento, por lo tanto mayor rigidez.

A 300 K es notoria la reducción de la movilidad de los residuos de la HA mutada. La interpretación de los resultados globales del comportamiento de las estructuras secundaria es difícil; a pesar de ello, al comparar los resultados se ve una ligera diferencia en el comportamiento, pero se requiere de un análisis puntual de las zonas donde se presenten las mutaciones para verificar el efecto de las mismas (Figura 23).



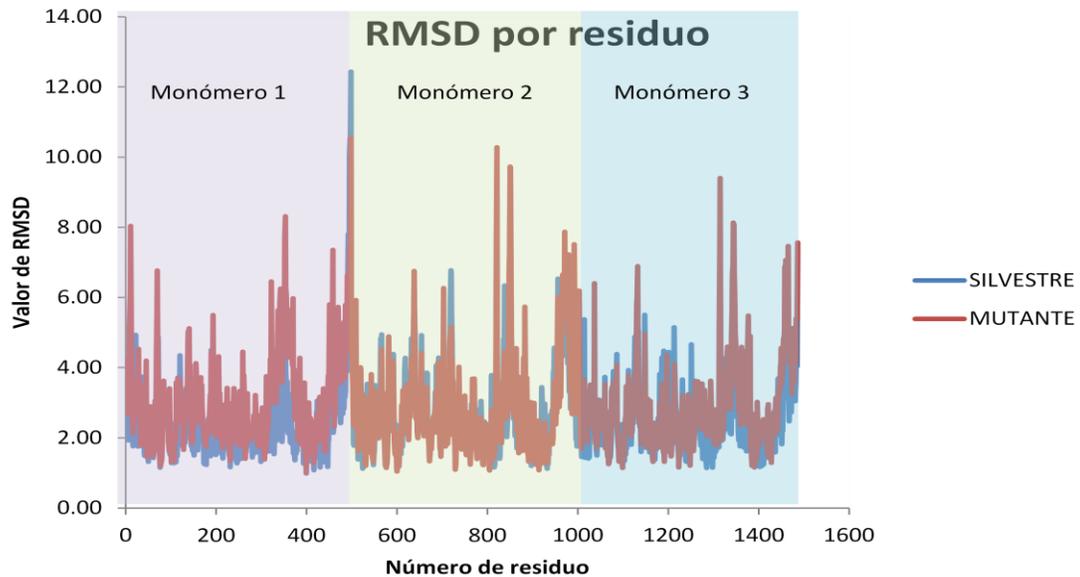
**Figura 23. Evolución de las estructuras secundarias a 300K.** Se muestra el comportamiento de las estructuras secundarias de A) HA silvestre y B) HA mutada. El color verde señala giros, el color amarillo representa  $\beta$ -plegamientos, el color azul  $\pi$ -hélices, y el color rosa  $\alpha$ -hélices.

Otra forma de examinar si las mutaciones fueron estabilizantes, es coloreando la estructura con base en sus valores de RMSD utilizando la herramienta VMDICE. Las estructuras de la figura 24, indican que la HA mutada a 300 K es más estable que la HA silvestre a la misma temperatura y también muestran las regiones en las cuales se presenta mayor diferencia en la movilidad. Como se observa, siguiendo el mismo código de colores empleado en las gráficas de RMSD, la mayor variación se presenta en la sección del tallo donde se realizaron las mutaciones.



**Figura 24. Estructuras de la HA silvestre y mutada, coloreadas con base en los valores del RMSD por residuo.** Visualización de las estructuras de las HAs coloreadas con respecto a sus valores de RMSD. A) HA silvestre a 300 K, B) HA mutada a 300 K. El código de colores es igual que el presentado en las gráficas del RMSD por residuo.

Finalmente, se examinaron los resultados a 400 K durante 10 ns de simulación. Dado que los archivos de salida del programa Gromacsv3.3.1 fueron muy grandes (aproximadamente 7Gigabytes por archivo) para la capacidad computacional disponible, se extrajeron los resultados numéricos de los valores de RMSD por residuo y se graficaron con el programa Microsoft Office Excel 2007. Al igual que en los resultados anteriores, la HA mutada presentó una disminución global de los valores de RMSD por residuo, lo que se evidencia en la disminución de la amplitud de los picos de la gráfica (Figura 25, color rojo).



**Figura 25. Gráfica del RMSD por residuo de las estructuras a 400 K.** Se muestran los valores de RMSD de cada residuo de la proteína HA silvestre (azul) y mutada (rojo); se aprecia una menor distorsión de la gráfica con la HA mutada.

Como se observa en las figuras 23 y 24, el aumento de la estabilidad es desigual en los monómeros de la HA; sin embargo, aunque no todas las subunidades presenten una mejoría evidente, las estructuras completas mostraron un aumento general en la estabilidad.

Por otro lado, debido a que la selección de las mutaciones fue con base a la formación de nuevos enlaces, se analizaron *in silico* las mutaciones para verificar la generación de interacciones. Se encontraron dos situaciones: 1) se formaron nuevos puentes salinos, principalmente, y en el caso de la sustitución E47W (cadenas B, D y F) se formó un enlace  $\pi$ - $\pi$  con una tirosina cercana o 2) las sustituciones generaron puentes salinos más fuertes, los cuales fueron capaces de mantenerse durante más tiempo de simulación.

#### 4. DISCUSIÓN.

Se produjeron pseudotipos retrovirales que presentaron en su superficie la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 y portan el gen que codifica a la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Se ha empleado como gen reportero el gen que codifica a la enzima luciferasa (Wang *et al.*, 2008), pero ésta tiene un corto tiempo en el cuál se puede realizar la lectura; por ello la detección con base en reacción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa con su sustrato, disminuye la posibilidad de lecturas erróneas generadas por el tiempo de reacción. En los ensayos de neutralización de la primera etapa, se planteó como punto de corte un porcentaje de neutralización  $\geq 50\%$  a una dilución de 1:40, para considerar sueros positivos a la influenza A(H1N1)pdm09. Esta dilución se eligió con base en estudios como el realizado por Kolokolstov y colaboradores en 2006, donde demostraron que en ensayos de neutralización empleando pseudotipos retrovirales, sueros con títulos de anticuerpos mayores a 1:40 son relevantes para indicar presencia de NAbs (Kolokolstov *et al.*, 2006).

Para la primera etapa se presentó una diferencia de 6.71% entre los resultados positivos del grupo control y los trabajadores del IMSS (26.71% vs 20%), la cual no resultó significativa ( $p=0.872$ ). Por lo tanto, a pesar de que se ha considerado a los trabajadores de la salud como un grupo de riesgo, confrontado con la población en general, no tuvieron mayor probabilidad de contraer la influenza A(H1N1)pdm09 debido a su empleo. Al igual que en informes elaborados en Hong Kong y Nueva Zelanda (Bandaranayake *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011), en este estudio los trabajadores de la salud no presentaron un mayor riesgo en contraer la infección; por el contrario, en el trabajo de Chan y colaboradores en el 2010 (Taiwan) reportaron una seroprevalencia significativamente mayor en los trabajadores de hospitales que en su grupo control, principalmente lo relacionaron con el contacto con pacientes con influenza A(H1N1)pdm09 ya que al separar los trabajadores que tienen contacto directo con pacientes de los que no, encontraron diferencia significativa entre los dos grupos (30.8% vs 12.6%,  $p<0001$ ) (Chan *et al.*, 2010). Es importante señalar que de los artículos mencionados, sólo en el de Nueva Zelanda efectuaron ensayos de microneutralización, es decir únicamente detectando NAbs (Bandaranayake *et al.*, 2010). Por otra parte, se reportó una disminución significativa en el porcentaje de positivos dentro del grupo de trabajadores de la salud en una investigación realizada en Monterrey, Nuevo León (Elizondo-Montemayor *et al.*, 2011), pero los autores señalan que la heterogeneidad de su grupo de comparación pudo influir en este resultado.

Los valores de seroprevalencia obtenidos son menores del 30% a pesar de que se trate del estudio de un virus pandémico, pero son cercanos a los estudios realizados hasta el momento de la presencia de anticuerpos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 (Bandaranayake *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Broberg *et al.*, 2011; Elizondo-Montemayor *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Las variaciones en los porcentajes reportados en estos trabajos sobre seroprevalencia, se atribuye a los diferentes puntos de corte para clasificar los casos positivos y el tipo de método aplicado para determinar la seropositividad. En nuestro estudio nos enfocamos a ensayos de neutralización porque éstos son capaces de detectar únicamente anticuerpos neutralizantes, es decir funcionales. Por ello, la detección de NAbS empleando los pseudotipos retrovirales es indicativa de la presencia de anticuerpos capaces de evitar la infección. Además, la controversia generada desde inicio de la pandemia acerca de cruce antigénico con virus anteriores, justifica el empleo de ensayos de microneutralización ya que se ha reportado que aquellos anticuerpos capaces de reconocer al virus de la influenza A(H1N1)pdm09 no necesariamente neutralizan al nuevo virus. Inclusive se publicó en un estudio realizado en el 2010, teniendo como grupo de estudio trabajadores de la salud, que de las muestras que presentaron reacción cruzada, únicamente el 18% de ellas contenían NAbS (Broberg *et al.*, 2011).

Los resultados de las tablas 5 a 11 muestran el porcentaje de individuos positivos obtenidos en la primera etapa de escrutinio, divididos por factores, con el fin de determinar si alguno favoreció a contraer la influenza A(H1N1)pdm09 dentro del grupo de estudio. Aunque en reportes anteriores se ha encontrado diferencia significativa en la seroprevalencia con respecto a grupos de edad (Broberg *et al.*, 2011), en nuestro estudio las edades no influyeron significativamente en la propensión a la enfermedad. Lo anterior se puede explicar con base en el rango de edades analizado, el cual no incluye niños ni adultos mayores (el trabajador de mayor edad fue de 71 años, y el siguiente de 67 años), grupos en los que en estudios realizados por otros grupos de investigación se ha encontrado un mayor porcentaje de seropositividad (Broberg *et al.*, 2011). El centro de trabajo al cual pertenecen los trabajadores si influyó en la probabilidad de contraer la infección, como se muestra en la tabla 5. Los trabajadores que exhibieron un menor riesgo fueron los pertenecientes al Hospital General de Zona No.2/Unidad Médica Familiar 26 (HG2/UMF26). Por el contrario, el Hospital Pediátrico del Centro Médico Nacional Siglo XXI (HPCMNSXXI) presentó un aumento en el riesgo de los trabajadores en contraer la enfermedad en comparación con los demás hospitales, además de ser el tercer centro con mayor porcentaje de positivos de la primera etapa. Cabe destacar que para los trabajadores del

Sindicato Nacional de Trabajadores del Seguro Social (SNTSS) y de la Coordinación de Salud en el Trabajo no se estimó el valor de OR debido al bajo número de muestras (n=10 y n=9). Gran parte de los centros analizados no presentaron una estimación de OR tal que muestre si existe un menor o mayor riesgo de contraer la influenza A(H1N1)pdm09 en esa institución (OR tomó un valor de uno dentro del rango de IC95%)

A pesar de que los trabajadores se dividieron por puesto de trabajo, con base en su posible exposición con personas infectadas, no se encontró diferencia significativa del porcentaje positivos por categoría laboral. De los reportes publicados hasta el momento donde diferencian entre trabajadores clínicos y el resto del personal, dos han señalado un aumento significativo en los casos positivos en trabajadores clínicos. En uno el análisis fue mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real (6% vs 4.3%  $p < 0.001$ ) (Balkhy *et al.*, 2010), y en otro trabajo, que empleó ensayos de HI, se obtuvieron valores de 30.8% vs 12.6%, ( $p < 0.001$ ) (Chan *et al.*, 2010). Los resultados que obtuvimos coinciden con lo reportado por Bandaranayake y colaboradores en el 2010, donde no encontraron diferencia significativa si los trabajadores mantienen contacto directo con pacientes contagiados (29.3% vs 25.3%). Inclusive el turno y la exposición por el medio de transporte utilizado o por mantener un segundo empleo no contribuyeron al aumento del riesgo de contraer la enfermedad.

Con respecto a contacto con casos de influenza A(H1N1)pdm09 o sospechoso, aunque la seroprevalencia fue mayor en el grupo que indicó haber estado en contacto con personas infectadas, no fue significativo si estuvo expuesto al virus, ni si éstas personas pertenecían a su familia o eran de su comunidad; pero si fue contrastante el riesgo conforme a número de personas con las que tuvo contacto. A pesar de que se esperaría una diferencia significativa con respecto al contacto, Toyokawa y colaboradores (2011) también señalaron que, a pesar del aumento en la seroprevalencia en trabajadores expuestos a pacientes infectados en contraste con los que no estuvieron en contacto, la diferencia no es significativa. Aquellos trabajadores que estuvieron con más de 5 personas posiblemente contagiadas, presentaron mayor frecuencia de positivos y mayor probabilidad de presentar un caso positivo a diferencia de los trabajadores que no estuvieron en contacto o con menos de 5 personas posiblemente infectadas (Tabla 8 y 10).

Se esperaba que las medidas de protección redujeran el número de positivos en los trabajadores que las emplearon, pero no influyeron en la prevención de contraer la infección. Es importante señalar, que sólo se reportó el uso de cubrebocas, goggles y bata. Como mencionó el Centro Nacional de

Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) en el reportaje del periódico La Jornada el 30 de abril del 2009, los cubrebocas únicamente son de utilidad en personas enfermas, por ello, al ser este el equipo de protección preferente en los trabajadores, no generó una reducción de casos positivos. La comparación de porcentajes obtenidos entre trabajadores de la salud que reportaron haber sido vacunados contra la influenza estacional y los que no, no fue significativa, teniendo un mayor porcentaje en aquellos vacunados. A diferencia del trabajo publicado por Labrosse y colaboradores en 2010, donde encontraron un ligero aumento en el título de anticuerpos en personas vacunadas contra la influenza estacional (A/Brisbane/59/2007) (Labrosse *et al.*, 2010), nuestros resultados no indican cruce antigénico al igual que reportó Hancock y colaboradores en el 2009 y según la información emitida en el 2009 por la CDC (Hancock *et al.*, 2009).

El grupo de trabajadores que recibieron antivirales como tratamiento para evitar contagiarse con el virus de la influenza (estacional o pandémico) mostró un mayor riesgo de contraer la infección. Este factor no es confiable para suponer que el uso del tratamiento confiere susceptibilidad de adquirir la enfermedad, ya que aunque se señale como tratamiento profiláctico ante la influenza, es probable que muchos trabajadores recibieran medicamento al presentar alguno de los síntomas.

La presencia de algunos de los síntomas de la influenza no se puede relacionar específicamente con influenza A(H1N1)pdm09, ya que muchas enfermedades comparten estos síntomas, por ello las comparaciones con respecto a estos no arrojó diferencias significativas. Los porcentajes presentados sobre confirmación e infección por influenza estacional o pandémica, tampoco señalaron diferencia significativa, además de ser un número reducido de trabajadores a los cuales se les confirmó el diagnóstico de influenza. Al desconocer el método de diagnóstico utilizado, no pudimos discernir entre positivos por virus de la influenza A o B y por lo tanto hacer una correlación con nuestros resultados.

Por otra parte se buscaron factores que pudieran contribuir al aumento del título de NAbS en los trabajadores de la salud. Para lo cual se analizaron las características de 48 sueros con títulos  $\geq 40$  que se evaluaron mediante curvas de neutralización. El género, características del trabajador, contacto con personas infectadas o medidas de protección no contribuyeron a aumentar significativamente los valores de GTM, los cuales quedaron dentro de un rango de 72.4 a 10000. En la literatura, gran parte de los trabajos publicados indican la seroprevalencia en su grupo de estudio con base en puntos de corte para indicar positivos. Se han señalado como positivos aquellos sueros que presenten títulos

≥40 mediante ensayos de HI (Bandaranayake *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2010; Chao *et al.*, 2011; Skowronski *et al.*, 2010; Toyokawa *et al.*, 2011) o valores ≥40 por MN (Zhou *et al.*, 2011). De los artículos donde muestran los valores de GTM que obtuvieron, especifican valores de 40 a 160 por ensayos de HI (Chan *et al.*, 2010); y de 13 a 211 por ensayos de MN (Skowronski *et al.*, 2010).

Como se observa en las tablas 12 y 13 los valores de GTMs que calculamos fueron mayores, posiblemente por que manejamos genes reporteros que aumentan la sensibilidad de los ensayos de MN (por quimioluminiscencia). Este mismo aumento en los títulos de NAbs, debido al empleo de pseudotipos retrovirales en ensayos de MN, ejemplificó Labrosse y colaboradores en el 2010, donde encontraron un aumento de 12 veces la GTM debido a la vacunación analizando con pseudotipos retrovirales, el cual es considerablemente mayor a los resultados con HI (≥80 después de la vacunación, teniendo antes valores <40). La limitante en el análisis realizado en este trabajo es que, a diferencia de varias publicaciones, no contamos con títulos base para comparar el efecto en la producción de anticuerpos mediada por la infección por la influenza A(H1N1)pdm09. Además el reducido número de sueros empleados para la comparación de los GTMs por cada factor, pudo haber enmascarado la importancia de alguno debido al número de muestras.

En cuanto a la búsqueda de sustituciones para aumentar la estabilidad de la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09, a diferencia del estudio trabajo publicado por Wang y colaboradores en el 2010, las mutaciones que seleccionamos no se encuentran en el sitio de unión a receptor (Wang *et al.*, 2010), ni se encuentran cerca del péptido de fusión (Yang *et al.*, 2010), por ello se espera que el efecto de estas mutaciones no impacte en sus funciones biológicas y sólo se relacione con la estabilidad. De las sustituciones seleccionadas (Figura 16) cuatro se encontraron en secuencias de diferentes virus de la influenza A(H1N1)pdm09 (N71K, E21K, N43H y Q62H) y las otras en secuencias de virus A(H1N1) de 1947, 1977 y 2005 (E47W, H72K y N81H, respectivamente).

Para determinar el efecto generado por las mutaciones, se introdujeron estas sustituciones en dos diferentes estructuras de HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09. La simulación a 600 K Permitió determinar una estabilización global de la HA mutada en condiciones extremas de temperatura. Las mutaciones también generaron un comportamiento diferente a nivel de estructuras secundarias, ya sea por la extensión del número de residuos que forman la estructura o por su mantenimiento durante el tiempo de simulación. Ya que a alta temperatura el movimiento y despliegue de las cadenas podría causar la formación de interacciones al azar debidas al acercamiento de residuos

distantes, se decidió realizar el análisis a temperaturas de 300 y 400 K. Al igual que a 600 K, se presentó la disminución de la movilidad de los residuos en la HA mutada y la variación en el comportamiento global de las estructuras secundarias fue más evidente a 300 K que a 600 K. Aunque el efecto de las mutaciones fue variable entre los monómeros, globalmente se obtuvo un aumento en la estabilización de la estructura de la HA, además se encontraron la formación de nuevos enlaces, primordialmente puentes salinos, o el mantenimiento de los puentes salinos, debido a la mutación de aminoácidos, durante un mayor tiempo de simulación.

Nos enfocamos principalmente a la búsqueda de formación de puentes salinos debido a que se ha señalado que este tipo de interacciones son necesarias para mantener unido al homotrímero durante tratamientos a diferentes pH (Rachakonda *et al.*, 2007).

Los resultados anteriores expusieron que las simulaciones de dinámica molecular fueron útiles en para la evaluación de los modelos estructurales de proteínas HAs, con ello se planteó que las siete sustituciones son capaces de afectar favorablemente la estabilidad de la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09. En un artículo publicado por Bloom y colaboradores en el 2009, predijeron mutaciones que podrían afectar la estabilidad de la HA del virus de influenza y usaron algunas de las predicciones para medir los efectos de la mutación experimentalmente. Para lo cual eligieron 12 mutaciones para analizar *in vitro* la capacidad del virus de la influenza A (H1N1) en mantenerse a altas temperaturas; de éstas únicamente cuatro mostraron mejoría (Bloom & Glassman, 2009).

A diferencia de este artículo, en donde a partir de árboles filogenéticos plantean ecuaciones para seleccionar por probabilidad posiciones en la HA que si son mutadas afectan la estabilidad de la proteína, en el presente trabajo directamente se analizó el efecto de las sustituciones seleccionadas, realizando simulaciones de dinámica molecular y buscando la generación de nuevas interacciones. Aunque se requiere de realizar estudios *in vitro*, esta exploración permite discernir entre posiciones favorables, reduciendo el tiempo del desarrollo experimental y el número de rediseños.

## 5. CONCLUSIONES.

Se obtuvieron pseudotipos retrovirales portadores de la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09, con valores de infectividad convenientes para emplearlos en ensayos de microneutralización.

Se encontraron siete mutaciones que favorecen la estabilidad de la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09, las cuales pueden facilitar en aplicaciones biotecnológicas.

A pesar de que los trabajadores de la salud tuvieron una mayor seroprevalencia que el grupo control (26.7% vs. 20%), esta no resultó significativa.

Los trabajadores pertenecientes al Hospital General de Zona No.2/Unidad Médica Familiar 26, tuvieron un menor riesgo de seroconversión en contraste con los demás centros de trabajo. Por el contrario, trabajadores del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI presentaron una mayor estimación de riesgo.

Aquellos trabajadores que estuvieron en contacto con más de cinco personas posiblemente infectadas, presentaron mayor frecuencia de positivos y por lo tanto un mayor riesgo de contraer la infección.

Contradictoriamente, en el grupo de trabajadores que recibió antivirales para prevenir la influenza A(H1N1)pdm09 aumentó significativamente el porcentaje de casos positivos pudiendo atribuirse al uso del medicamento como tratamiento contra la infección, en vez de medida profiláctica.

No se encontraron factores que contribuyan al aumento en el título de NAbs contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.

Aunque sólo identificamos tres variables que pueden contribuir al aumento de la seropositividad y del riesgo en los trabajadores del IMSS a contraer la influenza A(H1N1)pdm09, este trabajo presentó un indicio sobre de la diseminación del virus dentro de los hospitales del IMSS, las medidas de protección empleadas durante la pandemia y la situación de la seroprevalencia previo a la campaña de vacunación contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.

## **6. PROSPECTIVAS.**

Comparar los títulos de anticuerpos de las muestras pareadas, recuperadas antes y después de la campaña de vacunación contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.

Evaluar el efecto de las mutaciones en la HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09, mediante ensayos *in vitro*.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Alberini, I., del-Tordello, E., Fasolo, A., Temperton, N., Galli, G., Gentile, C., Montomoli, E., Hilbert, A.K., Banzhoff, A., del-Giudice, G., Donnelly, J., Rappuoli, R., Capecchi, B. *Pseudoparticle neutralization is a reliable assay to measure immunity and cross-reactivity to H5N1 influenza viruses*. *Vaccine* 27(43):5998-6003, 2009.
2. Ambrozaitis, A., Groth, N., Bugarini, R., Sparacio, V., Podda, A., Lattanzi, M. *A novel mammalian cell-culture technique for consistent production of a well-tolerated and immunogenic trivalent subunit influenza vaccine*. *Vaccine* 27(43):6022-6029, 2009.
3. Arias, C. F., Escalera-Zamudio, M., Soto-del Río, M. D., Cobián-Güemes, A. G., Isa, P., López, S. *Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1)*. *Archives of Medical Research* 40:643-654, 2009.
4. Balbuena, P.B., Seminario, J.M. *Molecular Dynamics: From Classical to Quantum Methods*. Elsevier Science, 1ª edición p: 1-20, 1999.
5. Balkhy, H.H., El-Saed, A., Sallah, M. *Epidemiology of H1N1 (2009) influenza among healthcare workers in a tertiary care center in Saudi Arabia: A 6-month surveillance study*. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 31(10): 1004-1010, 2010.
6. Bandaranayake, D., Huang, Q.S., Bissielo, A., Wood, T., Mackereth, G., Baker, M.G., Beasley, R., Reid, S., Roberts, S., Hope, V. *Risk factors and immunity in a nationally representative population following the 2009 influenza A(H1N1) pandemic*. *PLoS ONE* 5(10): e13211, 2010.
7. Beck, E. T., Jurgens, L. A., Kehl, S. C., Bose, M. E., Patitucci, T., LaGue, E., Darga, P., Wilkinson, K., Witt, L. M., Fan, J., He, J., Kumar, S., Henrickson, K. J. *Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin*. *Journal of Molecular Diagnostics* 12(1):1-8, 2009.
8. Bloom, J.D., Glassman, M.J. *Inferring stabilizing mutations from protein phylogenies: Application to influenza hemagglutinin*. *PLoS Computational Biology* 5(4): e1000349, 2009.
9. Bouvier, N. M., Palese, P. *The biology of influenza viruses*. *Vaccine* 26S: D49-D53, 2008.
10. Brammer, L., Bresee, J., Smith, N., Klimov, A., Cox, N. *VPD Surveillance Manual* 4ª edición, pp. 6.1-6.9. Nueva York, 2008.
11. Brincks, E. L., Kucaba, T. A., Legge, K. L., Griffith, T. S. *Influenza-induced expression of functional TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) on human PBMC*. *Human Immunology* 69(10):634-646, 2008.

12. Broberg, E., Nicoll, A., Amato-Gauci, A. *Seroprevalence to influenza A (H1N1) 2009 virus- Where are we?* Clinical and Vaccine Immunology 18(8):1205-1212, 2011.
13. Brownlee, G. G., Fodor, E. *The predicted antigenicity of the hemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin.* Philosophical Transactions of the Royal Society of London 356:1871-1876, 2001.
14. Chan, M., Cheung, C., Cui, W., Tsao, S., Nichols, J., Chan, Y., Chan, R., Long, H. *Proinflammatory cytokine response induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells.* Respiratory Research 6:135-148, 2005.
15. Chan, Y. J., Lee, C. L., Hwang, S. J., Fung, C. O., Wang, F. D., Yen, D. H. T., Tsai, C. H., Chen, Y. M. A., Lee, S. D. *Seroprevalence of antibodies to pandemic (H1N1) 2009 influenza virus among hospital staff in a medical center in Taiwan.* Journal of Chinese Medical Association 73(2): 62-66, 2010.
16. Chan, K-H., To, K.K.W., Hung, I.F.N., Zhang, A.J.K., Chan, J.F.W., Cheng, V.C.C., Tse, H., Che, X-Y., Chen, H., Yuen, K.Y. *Differences in antibody responses of individuals with natural infection and those vaccinated against pandemic H1N1 2009 influenza.* Clinical and Vaccine Immunology 18(5): 867-873, 2011.
17. Chao, D-Y., Cheng, K-F., Li, T-C., Wu, T-N., Chen, C-Y., Tsai, C-A., Chen, J-H., Chiu, H-T., Lu, J-J., Su, M-H., Liao, Y-H., Chan, W-C., Hsieh, Y-H. *Serological evidence of subclinical transmission of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus outside of Mexico.* PLoS ONE 6(1):e14555, 2011.
18. Chen, Z., Wang, W., Zhou, H., Suguitan, A. L., Shambaugh, C., Kim, L., Zhao, J., Kemble, G., Jin, H. *Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs.* Journal of Virology 84(1):44-51, 2010.
19. Cheung, C. Y., Poon, L. L. M., Lau, A. S., Luk, W., Lau, Y. L., Shortridge, K. F., Gordon, S., Guan, Y., Peiris, J. S. M. *Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?* Mechanism of disease THE LANCET 360:1831-1837, 2002.
20. Combadière, B., Sibénil, S., Duffy, D. *Keeping the memory of influenza viruses.* Pathologie Biologie 58: e79-e86, 2010.
21. Cronin, J., Zhang, X.-Y., Reiser, J. *Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping.* Current Gene Therapy 5(4): 387-398, 2005.
22. Deem, M. W., Pan, K. *The epitope regions of HI-subtype influenza A with application to vaccine efficacy.* Protein Engineering, Design & Selection July (3): 1-4, 2009.

23. Echevarría-Zuno, S., Mejía-Aranguré, J. M., Mar-Obeso, A. J., Grajales-Muñiz, C., Robles-Pérez, E., González-León, M., Ortega-Alvarez, M. C., González-Bonilla, C., Rascón-Pacheco, R. A., Borja-Avurto, V.H. *Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis*. THE LANCET 374(9707):2072-2079, 2009.
24. Elizondo-Montemayor, L., Álvarez, M.M., Hernández-Torre, M., Ugalde-Casas, P.A., Lam-Franco, L., Bustamante-Careaga, H., Castilleja-Leal, F., Contreras-Castillo, J., Moreno- Sánchez, H., Tamargo-Barrera, D., López-Pacheco, F., Freiden, P.J., Schultz-Cherry, S. *Seroprevalence of antibodies to influenza A/H1N1/2009 among transmission risk groups after the second wave in Mexico, by a virus-free ELISA method*. International Journal of Infectious Diseases 15(11):e781-e786, 2011.
25. Gallaher, W. R. *Towards a sane and rational approach to management of influenza H1N1 2009*. Virology Journal 6(51):1-7, 2009.
26. Gamblin, S.J., Skehel, J.J. *Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins*. The Journal of Biological Chemistry 285(37):28403-28409, 2010.
27. García J-M., Lai, J.C.C. *Production of influenza pseudotyped lentiviral particles and their use in influenza research and diagnosis: an update*. Expert Review of Anti-Infective Therapy 9(4): 443-455, 2011.
28. Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balis, 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., de Graad, 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., 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., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C. B., Shaw, M., Jernigan, D. B., Uyeki, T. M., Smith, D. J., Klimov, A. I., Cox, N. J. *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans*. Science 325: 197-201, 2009.
29. Giroglou, T., Cinatl, J., Rabenau, H., Drosten, C., Schwalbe, H., Doerr, H. W., von Laer, D. *Retroviral vectors pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein*. Journal of Virology 78(17): 9007-9015, 2004.
30. Hancock, K., Veguilla V., Lu, X., Zhong, W., Butler, E.N., Sun, H., Liu, F., Dong, L., DeVos, J.R., Garguillo, P.M., Brammer, T.L., Cox, N.J., Tumpey, T.M., Katz, J.M. *Cross-reactive antibody response to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus*. The New England Journal of Medicine 361:1945-1952, 2009.

31. Hensley, S. E. *Que sera, sera: evolution of the swine H1N1 influenza A virus*. Expert Review of Anti-Infective Therapy 7(7):763-768, 2009.
32. Huang, Q., Rachakonda, P.S., Ludwig, k., Korte, T., Böttcher, C., Herrman, A. *Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state. Stability and energetics of the hemagglutinin*. Biochimica et Biophysica Acta 1614:3-13, 2003.
33. Humprey, W., Dalke, A., Schulten, K. *VMD-Visual Molecular Dynamics*. Journal of Molecular Graphics 14.1(33-38), 1996.
34. Kaiser, J. *Influenza News: A one-size-fits-all flu vaccine?* Science 312:380-382, 2006.
35. Klenk, H.D., Garten, W., Matrosovich, M. *Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic*. Bioessays Journal 33(3):180-188, 2011.
36. Knossow, M., Skehel, J. J. *Variation and infectivity neutralization in influenza*. Immunology 119:1-7, 2006.
37. Kolokoltsov, A. A., Wang, E., Colpitts, T. M., Weaver, S. C., Davey, R. A. *Pseudotypes viruses permit rapid detection of neutralizing antibodies in human and equine serum against Venezuelan equine encephalitis virus*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 75(4): 702-709, 2006.
38. Kong, W-P., Hood, C., Wei, C-J., García-Sastre, A., Tumpey, T.M., Nabel, G.J. *Protective immunity to lethal challenge of the 1918 pandemic influenza virus by vaccination*. PNAS 103(43):15987-15991, 2006.
39. Kreijtz, J.H.C.M., Fouchier, R.A.M., Rimmelzwaan, G.F. *Immune responses to influenza virus infection*. Virus Research 162:19-30, 2011.
40. Kuri-Morales, P., Betancourt-Cravioto, M., Velázquez-Monroy, O., Alvarez-Lucas, C., Tapia-Conyer, R. *Pandemia de influenza: la respuesta de México*. Salud Pública de México 48(1):72-79, 2006.
41. Labrosse, B., Tourdjman, M., Porcher, R., LeGoff, J., de Lamballerie, X., Simon, F., Molina, J.M., Clavel. *Detection of extensive cross-neutralization between pandemic and seasonal A/H1N1 influenza viruses using a pseudotype neutralization assay*. PLoS ONE 5(6): e11036, 2010.
42. Lackenby, A., Hungnes, O., Dudman, S.G., Meijer, A., Paget, W.J., Hay, A.J., Zambon, M.C. *Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe*. Eurosurveillance 13(5):ppi8026, 2008.

43. Lee, K. K. *Architecture of a nascent viral fusion pore*. The EMBO Journal 29:1299-1311, 2010.
44. Leuwerke, B., Kitikoon, P., Evans, R., Thacker, E. *Comparison of three serological assays to determine the cross-reactivity of antibodies from eight genetically diverse U.S. swine influenza viruses*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20:426-432, 2008.
45. Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. *GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis*. Journal of Molecular Modeling 7:306-317, 2001.
46. Marshall, C., Kelso, A., McBryde, E., Barr, I.G., Eisen, D.P., Sasadeusz, J., Busing, K., Cheng, A.C., Johnson, P., Richards, M. *Pandemic (H1N1) 2009 risk for frontline health care workers*. Emerging Infectious Diseases 17(6): 1000-1006, 2011.
47. Martínez-Sobrido, L., Cadagan, R., Steel, J., Basler, C. F., Palese, P., Moran, T. M., García-Sastre, A. *Hemagglutinin-pseudotyped GFP-expressing influenza viruses for the detection of influenza virus neutralizing antibodies*. Journal of Virology 84(4):2157-2163, 2009.
48. Miller, E., Hoschler, K., Hardelid, P., Stanford, E., Andrews, N., Zambon, M. *Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study*. THE LANCET 375(9720):1100-1108, 2010.
49. Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H., Barman, S. *Influenza virus morphogenesis and budding*. Virus Research 143:147-161, 2009.
50. Nayak, J. L., Richards, K. A., Chaves, F. A., Sant, A. J. *Analyses of the specificity of CD4 T cells during the primary immune response to influenza virus reveals dramatic MHC-linked asymmetries in reactivity to individual viral proteins*. Viral Immunology 23(2):169-180, 2010.
51. Ndifon, W., Dushoff, J., Levin, S. A. *On the use of hemagglutination-inhibition for influenza surveillance: Surveillance data are predictive of influenza vaccine effectiveness*. Vaccine 27: 2447-2452, 2009.
52. Nefkens, I., García, J-M., Ling, C.S., Lagarde, N., Nicholls, J., Tang, D.J., Peiris, M., Buchy, P., Altmeyer, R. *Hemagglutinin pseudotyped lentiviral particles: Characterization of a new method for avian H5N1 influenza sero-diagnosis*. Journal of Clinical Virology 39:27-33, 2007.
53. Nelli, R.K., Kuchipudi, S.V., White, G.A., Baquero-Pérez, B., Dunham, S.P., Chang, K-C. *Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig*. BMC Veterinary Research 6:4, 2010.
54. Neumann, G., Kawaoka, Y. *The first influenza pandemic of the new millennium*. Influenza and other respiratory virus 5(3): 157-166, 2011.

55. Neuzil, K. M., Bright, R. A. *Influenza vaccine manufacture: Keeping up with change*. J. Infectious Diseases 200: 835-837, 2009.
56. Oh, S., Selleck, P., Temperton, N.J., Chan, P.K.S., Capecchi, B., Manavis, J., Higgins, G., Burrell, C.J., Kok, T. *Neutralizing monoclonal antibodies to different clades of Influenza A H5N1 viruses*. Journal of Virological Methods 157:161-167, 2009.
57. Pannig, M., Eickmann, M., Landt, O., Monazahian, M., Ölschläger, S., Baumgarte, S., Reischl, U., Wenzel, J. J., Niller, H. H., Günter, S., Hollman, B., Huzly, D., Drexler, J. F., Helmer, A., Becker, S., Matz, B., Eis-Hübinger, A. M., Drosten, C. *Detection of influenza A (H1N1)v virus by real-time RT-PCR*. Euro Surveillance 14(36):p11.19329, 2009.
58. Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K. *Scalable molecular dynamics with NAMD*. Journal of Computational Chemistry 26:1781-1802, 2005.
59. Rachakonda, P.S., Veit, M., Korte, T., Ludwig, K., Böttcher, C., Huang, Q., Schmidt, M.F.G, Herrmann, A. *The relevance of salt bridges for the stability of the influenza virus hemagglutinin*. The FASEB Journal 21:995-1002, 2007.
60. Ross, T., Zimmer, S., Burke, D., Crevar, C., Carter, D., Stark, J., Gils, B., Zimmerman, R., Ostroff, S., Lee, B. *Seroprevalence following the second wave of pandemic 2009 H1N1 influenza*. PLoS Current Influenza February 24: RRN1148, 2010.
61. Rowe, T., Abernathy, R. A., Hu-Primmer, J., Thompson, W. W., Lu, X., Lim, W., Fukuda, K., Cox, N. J., Katz, J. M. *Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays*. Journal of Clinical Microbiology 37(4):937-943, 1999.
62. Russell, R. J., Gamblin, S. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., Skehel, J. J. *H1 and H7 influenza hemagglutinin structures extend a structural classification of hemagglutinin subtypes*. Virology 325: 287-296, 2004.
63. Russell, R. J., Kerry, P. S., Stevens, D. J., Steinhauer, D. A., Martin, S. R., Gamblin, S. J., Skehel, J. J. *Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion*. PNAS 105(46):17736-17741, 2008.
64. Ryan, J.T. *Pandemic influenza: Emergency, planning and community preparedness*. CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 40-44. Florida, 2009.
65. Sambrook, J., Russell, D.W. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición vol. 1 pp. 1.31-34, 1.116-118, 5.14-17. Nueva York, 2001.

66. Sandoval R. F. E. *Producción de pseudotipos retrovirales portadores de la hemaglutinina de virus de influenza A y su aplicación en ensayos de neutralización* [tesis de maestría]. ENCB-IPN, 2011.
67. Schmitt, A. P., Lamb, R. A. *Influenza virus assembly and budding at the viral budzone*. *Advanced in Virus Research*, 64:383-416, 2005.
68. Skehel, J. J., Wiley, D.C. *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin*. *Annual Review of Biochemistry* 69:531-569, 2000.
69. Skowronski, D.M., Hottes, T.S., Janjua, N.Z., Purych, D., Sabaiduc, S., Chan, T., De Serres, G., Gardy, J., McElhaney, J.E., Patrick, D.M., Petric, M. *Prevalence of seroprotection against the pandemic (H1N1) virus after the 2009 pandemic*. *Canadian Medical Association Journal* 182(17): 1851-1856, 2010.
70. Tate, M.D., Ioannidis, L.J., Croker, B., Brown, L.E., Brooks, A.G., Reading, P.C. *The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice*. *PLoS ONE* 6(3):e17618, 2011.
71. Temperton, N. J., Hoschler, K., Major, D., Nicolson, C., Manvell, R., Hien, V. M., Ha, D. Q., de Jong, M., Zambon, M., Takeuchi, Y., Weiss, R. A. *A sensitive retroviral pseudotype assay for influenza H5N1-neutralizing antibodies*. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1(3): 105-112, 2007.
72. Tian, L-L., Shi, W-X., Deng, Y., Pang, X-H., Yang, P., Huang, F., Cui, S-J., Zhang, X., Zhang, D-T., Wang, Q-Y. *Serologic survey of pandemic influenza A (H1N1 2009) in Beijing, China*. *Preventive Medicine* 52(1):71-74, 2010.
73. Toyokawa, T., Sunagawa, T., Yahata, Y., Ohyama, T., Kodama, T., Satoh, H., Ueno-Yamamoto, T., Arai, S., Araki, K., Odaira, F., Tsuchihashi, Y., Takahashi, H., Tanaka-Taya, K., Okabe, N. *Seroprevalence of antibodies to pandemic (H1N1) 2009 influenza virus among health care workers in two general hospitals after first outbreak in Kobe, Japan*. *Journal of Infection* 63(4):281-287, 2011.
74. Trebbien, R., Larsen, L.E., Viuff, B.M. *Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs*. *Virology Journal* 8:434, 2011.
75. Van Poucke, S.G.M., Nicholls, J.M., Nauwynck, H.J., Van Reeth, K. *Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution*. *Virology Journal* 7:38, 2010.
76. Wang, W., Butler, E. N., Veguilla, V., Vassell, R., Thomas, J. T., Moos, M., Ye, Z., Hancock, K., Weiss, C. *Establishment of retroviral pseudotypes with influenza hemagglutinins from H1, H3,*

- and H5 subtypes for sensitive and specific detection of neutralizing antibodies. Journal of Virological Methods* 153: 111-119, 2008.
77. Wang, W., Xie, H., Ye, Z., Vassell, R., Weiss, C.D. *Characterization of lentiviral pseudotyped with influenza H5N1 hemagglutinin and their performance in neutralization assays. Journal of Virological Methods* 165:305-310, 2010a.
78. Wang, W., Castelán-Vega, J.A., Jiménez-Alberto, A., Vassell R. *A mutation in the receptor binding site enhances infectivity of 2009 H1N1 influenza hemagglutinin pseudotypes without changing antigenicity. Virology* 407:374-380, 2010b.
79. Weissenhorn, W., Hinz, A., Gaudin, Y. *Virus membrane fusion. FEBS Letters* 581:2150-2155, 2007.
80. Yang, H., Carney, P., Stevens, J. *Structure and receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin. PLoS Currents: Influenza. Marzo22: RRN1152, 2010.*
81. Yassine, H.M., Lee, C-W., Gourapura, R., Saif, Y.M. *Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors. Animal Health Research Reviews* 11(1): 53-72, 2010.
82. Zhou, Y., Ng, D.M.W., Seto, W.-H., Ip, D.K.M, Kwok, H.K.H., Ma, E.S.K., Ng, S., Lau, L.L.H., Wu, J.T., Peiris, J.S.M., Cowling, B.J. *Seroprevalence of antibody to pandemic influenza A (H1N1) 2009 among healthcare workers after the first wave in Hong Kong. Journal of Hospital Infection* 78(4):308-311, 2011.

## URLs.

1. Servidor en línea del Centro Bioinformático de la Universidad de Kyoto, Alineamiento múltiple de secuencias por MAFFT v6.240: <http://www.genome.jp/tools/mafft/>, 28/09/2010.
2. Sitio de la Base de Datos de Enzimas de Restricción: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>; 10/12/2010.
3. Sitio de la Organización Mundial de las Naciones Unidas, comunicado sobre formulación de vacunas para la temporada de invierno 2011-2012): [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/2011\\_12north/en/index.html](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/2011_12north/en/index.html), 20/04/2011.
4. Sitio de la Organización Mundial de las Naciones Unidas, nomenclatura del virus de la influenza A(H1N1)pdm09: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/terminology\\_ah1n1pdm09/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/terminology_ah1n1pdm09/en/), 18/10/2011.
5. Sitio de la Organización Mundial de las Naciones Unidas, situación mundial de la influenza A(H1N1)pdm09: [http://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/updates/en/index.html](http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en/index.html), 28/11/2011.
6. Sitio de la Secretaria de Salud de México: <http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza/estadisticas.html> , 21/11/2011.

ANEXO I.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
CUESTIONARIO DE ESTUDIO DE PREVALENCIA DE INFECCION DE INFLUENZA EN  
TRABAJADORES DE LA SALUD EN EL IMSS. 2009

Le solicitamos su participación en este estudio, para lo cual le pedimos conteste todas las preguntas del siguiente cuestionario. Llene los espacios o marque con una cruz la opción seleccionada. La información que usted nos proporciona será manejada de forma confidencial, con propósitos de investigación para elaborar programas de prevención y control de riesgos biológicos y no afectará su relación laboral.

	Area de Codificación
Folio _____ Folios: DF Norte. 100 ___ DF Sur. 200 ___ Edo Mex Ote. 300 ___ Edo Mex Pte. 400 ___	<input type="text"/>
Fecha de la Encuesta _____ Día Mes año	<input type="text"/>
Por favor escriba su nombre completo. Nombre _____ Apellidos _____	
1.-Me podría decir su fecha de nacimiento: _____ Día Mes año	<input type="text"/>
2.-Su genero es: 0.- Hombre _____ 1.- Mujer _____	<input type="text"/>
3.-Me podría decir su domicilio completo Calle _____ número exterior e interior, _____ Colonia. Código postal delegación _____ teléfono. _____	
4.-Su correo electrónico es: _____	<input type="text"/>
<b>EMPLEO ACTUAL EN EL IMSS</b> 6.-El nombre del centro de Trabajo es: _____	
7.-La Unidad donde labora y/o realiza su residencia médica es: 1.- UMF ___ 2.- HGZ ___ 2bis.- HGR ___ 3.- UMAE ___ 4.- Otro (especifique) _____	<input type="text"/>
8.-La delegación a la que pertenece su Unidad es: 1.- DF Norte ___ 2.- DF Sur ___ 3.- Edo de Mex. Ote. ___ 4.- Edo de Mex. Pte. ___	<input type="text"/>
9.-Me podría proporcionar el teléfono y la extensión donde se le puede localizar Tel _____ ext. _____	

10. CATEGORIA. Podría tachar cual es su categoría de trabajo en el IMSS: 1. Médico Familiar _____ 2. Médico No Familiar (especifique especialidad) _____ 3. Residente (especifique especialidad y año que cursa) _____ 4. Médico Interno de pregrado _____ 5. Enfermera _____ 6. Aux. de Enfermera _____ 7. Jefa o Subjefa enfermeras _____ 8. Laboratorista _____ 9. Odontólogo _____ 10. Fisioterapeuta _____ 11. Técnico de Rayos X _____ 12. Asistentes Médicas _____ 13. Auxiliar Univ. de Ofnas. _____ 14. Trabajadores de Intendencia _____ 15. Otra (especifique) _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
11.- ¿A que servicio pertenece?: _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
12.- El turno en que labora usted es: 1. Matutino _____ 2.- Vespertino _____ 3.- Nocturno _____ 4. Otro (especifique) _____	<input type="text"/>
13.- ¿Me puede decir su antigüedad en su actual categoría? (años y meses) _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
14.- ¿Me puede decir su antigüedad en este centro de trabajo? (años y meses) _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
15.- ¿Me puede decir su antigüedad en el servicio actual? (años y meses) _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
16.- Usted se transporta a su trabajo en: 1.- Su auto _____ 2. Taxi _____ 3 Metro _____ 4. Metrobus _____ 5. Combi _____ 6. Otro _____ 7. Combinado (especifique la combinación) _____	<input type="text"/>
17.- Cuanto tiempo tarda en transportarse de su casa a su trabajo (horas y minutos) _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>OTRO EMPLEO</b> 18.- Usted labora en otra institución de Salud 1. Si _____ 0.- No. _____	<input type="text"/> <input type="text"/>
19.- En que Institución de Salud _____	
20.- En que horario labora en su otro empleo _____	<input type="text"/>
21.- Que antigüedad tiene en el otro empleo _____	<input type="text"/>
22.- ¿A que servicio pertenece?: _____	<input type="text"/>
23.- En el otro empleo tiene contacto con pacientes 1. Si _____ 0.- No. _____	<input type="text"/>

<p><b>CONTACTOS EN EMPLEO ACTUAL</b></p> <p>24.-Ha tenido usted contacto directo <b>con pacientes</b> de marzo hasta el día de hoy (definido contacto directo laboral como aquel trabajador de la salud que ha tenido contacto a 1 metro o menos de distancia <b>con una persona con sospecha o confirmación de influenza en su centro de trabajo del IMSS</b>):</p> <p>1. Si _____ 0. – No _____ <b>pasar a la pregunta 33</b></p>	<input type="text"/>
<p>25.-Si su respuesta anterior fue afirmativa, podría usted mencionar el número aproximado de personas con sospecha o confirmación con virus de influenza de los pacientes con los cuales ha tenido contacto directo _____</p> <p>26.-Podría especificar la fecha aproximada del contacto o contactos: _____</p>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<p>27.-¿Cuál es la edad promedio de los pacientes que atiende en su servicio? _____ años</p>	<input type="text"/>
<p>28.-¿Cuál es el promedio de pacientes en general que atiende diariamente en promedio en su servicio? _____</p>	<input type="text"/>
<p>29.- Especifique en número aproximado de pacientes con sospecha o confirmación de influenza a los cuales ha estado expuesto de enero hasta el día de hoy: _____</p>	<input type="text"/>
<p>30.- En caso de haber tenido contacto directo con pacientes con sospecha o confirmación de influenza señale el tiempo aproximado de exposición diaria:</p> <p>1. Esporádicamente(minutos) _____ 2. Menos de 1 hora diaria _____ 3. Entre 1 y 2 horas diarias _____</p> <p>4. Entre 2 y 3 horas diarias _____ 5.- Mas de 3 hasta 6 horas diarias _____ 6. Mas de 6 horas diarias _____</p>	<input type="text"/>
<p>31.-En caso de ser trabajador de laboratorio clínico o de anatomía patológica, ha tenido contacto con muestras de secreción respiratoria o muestras de líquidos, tejidos u órganos de pacientes con sospecha o confirmación de influenza: 1. Si _____ 0. – No _____ <b>(pase a la pregunta 33)</b></p>	<input type="text"/>
<p>32. En caso que la respuesta anterior haya sido afirmativa, especifique la fecha aproximada del primer contacto con dicha muestra, espécimen o cadáver: _____</p>	<input type="text"/>

CONTACTOS EN OTRO EMPLEO	4
<p>33.- Ha tenido usted contacto directo con <b>pacientes</b> de marzo hasta el día de hoy (definido contacto directo laboral como aquel trabajador de la salud que ha tenido contacto a 1 metro o menos de distancia con una <b>persona con sospecha o confirmación de influenza en su otro empleo</b>):</p> <p>1. Si _____ 0. – No _____ <b>pase a la pregunta 40</b></p>	<input type="text"/>
<p>34.- Si su respuesta anterior fue afirmativa, podría usted mencionar el número aproximado de personas con sospecha o confirmación con virus de influenza de los pacientes con los cuales ha tenido contacto directo _____</p>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<p>35.- Podría especificar la fecha aproximada del contacto o contactos: _____</p>	
<p>36.- ¿Cuál es la edad promedio de los pacientes que atiende en su servicio? _____ años</p>	<input type="text"/>
<p>37.- ¿Cuál es el promedio de pacientes en general que atiende diariamente en promedio en su servicio? _____</p>	<input type="text"/>
<p>38.- Especifique en número aproximado de pacientes con sospecha o confirmación de influenza a los cuales ha estado expuesto de marzo hasta el día de hoy: _____</p>	<input type="text"/>
<p>39.- En caso ha tenido contacto directo con pacientes con sospecha o confirmación de influenza señale el tiempo aproximado de exposición diario:</p> <p>1. Esporádicamente(minutos) _____ 2. Menos de 1 hora diaria _____ 3. Entre 1 y 2 horas diarias _____</p> <p>4. Entre 2 y 3 horas diarias _____ 5.- Mas de 3 hasta 6 horas diarias _____ 6. Mas de 6 horas diarias _____</p>	<input type="text"/>
<p>40.- En caso de ser trabajador de laboratorio clínico o de anatomía patológica, ha tenido contacto con muestras de secreción respiratoria o muestras de líquidos, tejidos u órganos de pacientes con sospecha o confirmación de influenza:</p> <p>1. Si _____ 0. – No _____</p>	<input type="text"/>
<p>41.- En caso que la respuesta anterior haya sido afirmativa, especifique la fecha aproximada del primer contacto con dicha muestra, espécimen o cadáver: _____</p>	<input type="text"/>

<p><b>CONTACTOS FAMILIARES O COMUNITARIOS</b></p> <p>42.- Ha tenido contacto <b>directo comunitario</b> del mes de marzo hasta el día de ayer (definido contacto directo comunitario como aquel trabajador de la salud que ha tenido contacto a 1 metro o menos de distancia con una persona con sospecha o confirmación de influenza en su <b>familia</b> (esposa, hijos, padres, hermanos, etc) o de <b>la comunidad</b> (vecinos, compañeros de trabajo, de escuela, u otro):</p> <p>1. Sí _____ 0.- No _____ pase a la pregunta 49.</p>	<input type="text"/>
<p>43. En caso la respuesta anterior sea positiva podría mencionar el número aproximado de personas con sospecha o confirmación con virus de influenza de su <b>familia</b> _____ en la <b>comunidad</b> _____ con los cuales se ha tenido contacto directo: _____</p>	<input type="text"/>
<p>44.- Especificar la fecha aproximada de contacto familiar _____</p>	<input type="text"/>
<p>45.- Especificar la fecha aproximada de contacto comunitario _____</p>	<input type="text"/>
<p>46.- Si su respuesta anterior fue afirmativa, podría usted mencionar el número aproximado de personas con sospecha o confirmación con virus de influenza de los familiares, vecinos o compañeros de trabajo con los cuales ha tenido contacto directo _____</p>	<input type="text"/>
<p>47.- Por favor especifique el tipo de contacto que <b>ha sido</b></p> <p><b>Familiar</b></p> <p>1. Esposa (o) _____</p> <p>2. Padre _____</p> <p>3. Madre _____</p> <p>4. Hija (o)s _____</p> <p>5. Otros (especifique) _____</p> <p><b>Comunitario</b></p> <p>11. Vecinos _____</p> <p>12. Compañero(as) de trabajo _____</p> <p>13. Compañero(as) de escuela _____</p> <p>14. Otro (especifique) _____</p>	<input type="text"/>
<p>48.- En caso ha tenido contacto directo con los familiares, vecinos o compañeros de trabajo, con sospecha o confirmación de influenza señale el tiempo aproximado de contacto que tuvo con estas personas</p> <p>1. Esporádicamente (minutos) _____ 2. Menos de 1 hora diaria _____ 3. Entre 1 y 2 horas diarias _____</p> <p>4. Entre 2 y 3 horas diarias _____ 5.- Mas de 3 hasta 6 horas diarias _____ 6. Mas de 6 horas diarias _____</p>	<input type="text"/>
<p>49.-Ha sido <u>vacunado contra Influenza</u>: 1. Sí _____ 0.- No _____ <b>pase a la pregunta 57</b></p>	<input type="text"/>

		6
		FOLIO _____
50.- En que fecha fue vacunado contra la influenza _____ Día                      Mes                      Año		<input type="text"/>
51.-¿ Ha recibido tratamiento <b>profiláctico contra influenza?</b> 1.- Si _____ 0.- No _____ <b>pase a la pregunta 55</b>		<input type="text"/>
52.- Si su respuesta anterior fue afirmativa especifique la fecha de inicio del <b>tratamiento profiláctico:</b> _____		<input type="text"/>
53.- ¿Podría especificar que tipo de antiviral recibió y a que dosis? 54.a).- Antiviral recibido _____ 59.b).- Dosis: _____		<input type="text"/>
<b>ENFERMEDAD RESPIRATORIA AGUDA</b> 55 Ha presentado o presenta alguna manifestación de Enfermedad Respiratoria Aguda de enero hasta el día de hoy: 1.- Si _____ 0.- No _____		<input type="text"/>
56. Sus fecha de inicio fue: _____		<input type="text"/>
57. Si la respuesta anterior fue afirmativa, especifique los signos y síntomas presentados y la fecha de inicio: 57.a.Fiebre                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.b.Cefalea                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.c. Tos                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.d. Dolor de garganta                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.e. Rinorrea                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.f. Vómitos                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.g. Diarrea                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.h. Dolores articulares                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.i. Dolores musculares                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.j. Disnea                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____ 57.k. Estornudo                      1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____		<input type="text"/>
57.l. Otros: especifique: _____ 1.-Sí _____                      0.- No _____                      Fecha. _____		<input type="text"/>
58.- Ha recibido <b>tratamiento específico antiviral</b> contra influenza 1.-Si _____ 0.- No _____ <b>pase a la pregunta 61.</b>		<input type="text"/>
59.- Fecha inicio: _____		<input type="text"/>
60. Si la respuesta anterior haya sido afirmativa, Podría especificar que tipo de antiviral recibió y a que dosis. Antiviral recibido, _____ Dosis: _____		

**ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS**

61. Mencione usted si durante los últimos 5 años ha padecido las siguientes enfermedades y la fecha de diagnóstico:

- |                                  |           |            |              |
|----------------------------------|-----------|------------|--------------|
| 1. Enfermedades respiratorias    | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 2. Enfermedades Cardiovasculares | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 3. Diabetes                      | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 4. Hipertensión Arterial         | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 5. Enfermedades renales          | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 6.- Trasplantes                  | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 7. Intoxicaciones                | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 8.- Asma                         | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 9. Cáncer                        | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 10. Artritis reumatoide          | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 11. Lupus eritematoso            | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 12. Anemia de cualquier tipo     | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |
| 13. Otros: especifique: _____    |           |            |              |
|                                  | 1.-Si ___ | 0.- No ___ | Fecha. _____ |

62.- En caso trabaje en un servicio de (hospitalización, urgencia, consulta externa, laboratorio, etc.) señale los procedimientos de trabajo implementados en su servicio luego del conocimiento público de la epidemia

- |   |    |    |           |         |
|---|----|----|-----------|---------|
| 1. Notificación inmediata de casos              | Si | No | No aplica | No sabe |
| 2. Lavado de manos                              | Si | No | No aplica | No sabe |
| 3. Uso de equipo de Protección personal:        |    |    |           |         |
| 3.1. Mascarillas N95                            | Si | No | No aplica | No sabe |
| 3.2. Guantes                                    | Si | No | No aplica | No sabe |
| 3.3. Lentes de protección                       | Si | No | No aplica | No sabe |
| 4. Aislamiento individual de los casos          | Si | No | No aplica | No sabe |
| 5. Aislamiento de cohorte                       | Si | No | No aplica | No sabe |
| 6. Separación entre camas $\geq$ 1 metro        | Si | No | No aplica | No sabe |
| Limpieza diaria de las Áreas de hospitalización | Si | No | No aplica | No sabe |

**INFORMACIÓN SOBRE PRACTICAS DE CONTROL DE INFECCIONES**  
 En caso haya tenido contacto directo con pacientes con sospecha o confirmación de influenza especifique que tipo de protección utilizó y su frecuencia de uso:

	<i>Todos los días</i> (1)	<i>2 a 3 veces por semana</i> (2)	<i>Una vez por semana</i> (3)	<i>Una vez cada 15 días</i> (4)	<i>Nunca</i> (5)	<i>No recuerda</i> (99)
63.-Mascarilla quirúrgica o tapabocas						
64.- Respirador N95						
65.-Goggles						
66.- Protector facial						
67.- Guantes						
68.- Bata o delantal						
69.- Lavado de manos con agua y jabón						
70.- Uso de alcohol gel para manos						

71- En los casos que respondió nunca, podría usted decir los motivos de su respuesta

Mencione usted la frecuencia de uso de las medidas de protección personal antes de la aparición epidemia:

	<i>Todos los días</i> (1)	<i>2 a 3 veces por semana</i> (2)	<i>Una vez por semana</i> (3)	<i>Una vez cada 15 días</i> (4)	<i>Nunca</i> (5)	<i>No recuerda</i> (99)
72.- Mascarilla quirúrgica o tapabocas						
73.- Respirador modelo N95						
74.- Goggles o lentes de seguridad						
75.- Protector facial (careta)						
76.- Guantes						
77.- Bata o delantal						
78.- Lavado de manos con agua y jabón						
79.- Uso de alcohol gel para manos						

80.- En los casos que respondió nunca, podría usted decir los motivos de su respuesta

81.- Nombre del coordinador de la encuesta \_\_\_\_\_