

Virus influenza: Enigma del pasado y del presente

Maria Eugenia Manjarrez Zavala*
 Gabina Arenas López ‡

Palabras clave: Influenza, gripe, virus respiratorios, infecciones respiratorias agudas.

Key words: Influenza, cold, respiratory viruses, acute respiratory infections.

RESUMEN

Antecedentes: El virus de la influenza es biológica y bioquímicamente único. En el pasado causó pandemias con mortalidad elevada, y en la actualidad continúan originando epidemias con alto impacto en la salud y en la economía. Son tres los tipos inmunológicos del virus A, B y C que infectan al humano; además, los del tipo A también pueden infectar a un amplio rango de animales, en particular diversas especies de aves, cerdos y caballos.

Características: los virus presentan un genoma de ARN de polaridad negativo, segmentado, esta característica facilita el elevado grado de variabilidad, particularmente en los virus de tipo A, cuya variación es originada principalmente por mutación o por recombinación genética, este fenómeno se incrementa si el virus pasa de una especie animal a otra, lo que genera nuevos subtipos virales, los cambios más importantes se dan en las glucoproteínas, hemaglutinina y neuraminidasa.

Inmunidad: Se ha descrito que la resistencia depende de la inmunidad hacia las proteínas de superficie,

especialmente la hemaglutinina por tal motivo, cuando aparece un nuevo subtipo viral la población humana es sensible a la infección. Actualmente se cuenta con algunas vacunas, sin embargo, el éxito que se tiene con ellas es limitado en humanos. Las campañas de información sobre control y detección de casos por ahora son de gran importancia. Así, a pesar de los avances que se han logrado en la ciencia, el virus de la influenza continúa siendo un enigma.

ABSTRACT

Antecedents: The influenza virus is biologically and biochemically unique. It has caused pandemics of high mortality in the past, and continues to engender epidemics of consequential impact on health and economy. There are 3 immunological types which affect humans, virus A, B and C. Type A can also infect a wide range of animals, particularly birds of various species, pigs and horses.

Characteristics: The virus contains a segmented RNA genome of negative polarity; this characteristic favors the high degree of variability, especially of virus type A in which it arises by mutation or genetic recombination. This phenomenon is increased when the virus passes from one animal species to another, which generates new viral subtypes. The most important modifications are in the glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase.

Immunity: Resistance has been reported to depend on immunity to surface proteins, especially hemagglutinin. Therefore, each time a new viral subtype arises the human population is sensitive to infection. Some vaccines are available at present, however, their success in humans is limited. Informative campaigns on control and case detection are very impor-

* Depto. de Investigación en Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

‡ Depto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM.

Correspondencia:

Dra. María Eugenia Manjarrez Zavala, Depto. de Investigación en Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, col. Sección XVI, México, D. F., 14080

Trabajo recibido: 06-IX-99; Aceptado: 22-IX-99

tant. Despite scientific progress, the riddle of the influenza virus continues.

INTRODUCCIÓN

A finales de la segunda década del siglo XX, la humanidad sufrió el embate de uno de los virus respiratorios con mayor incidencia en el mundo, el virus de la "Influenza o gripe", el cual originó la muerte de alrededor de 20 millones de individuos¹⁻⁷. En la actualidad, el efecto devastador del virus no se presenta; sin embargo, aún existen casos de alta mortalidad, como los que se presentaron en Hong Kong en 1997-98⁸. En nuestro medio, las infecciones por estos virus tienen gran importancia en salud pública principalmente por la alta morbilidad. Estos virus pertenecen a la familia *Orthomixoviridae*⁴ y son clasificados en tres géneros o tipos: A, B y C dependiendo de las diferencias inmunológicas de las nucleoproteínas. En 1996, Murphy⁹ los agrupa en dos géneros, donde incluye A y B en uno, y C en otro. Influenza A, se relaciona con las grandes pandemias¹⁰, circula y se replica entre especies diversas de animales, aves y mamíferos¹¹⁻¹⁴. Las pandemias aparecen a intervalos regulares de tiempo (10 a 20) años, debido a la aparición de nuevos subtipos generados por la recombinación de regiones completas de genes, reordenamiento genético que genera cambios antigenicos mayores^{6,14,15}. Además del reordenamiento genético se pueden presentar mutaciones, que producen cambios inmunológicos menores, derivados genéticos, que dan origen a epidemias interpandémicas¹⁶. Influenza B, ocasiona epidemias, pero es incapaz de infectar a otras especies¹⁶; en cambio, influenza C, sólo causa cuadros gripales discretos o asintomáticos (Tabla I), no obstante se ha aislado de algunos animales⁵. El orden en el grado de variabilidad en los tres géneros de influenza es: A>B>C (Tabla I)^{6,13,16,17}. Esta variabilidad ha impedido la generación de vacunas efectivas para la prevención y control de la enfermedad^{18,22}.

Dentro del cuadro clínico se presenta la siguiente sintomatología: fiebre, síntomas respiratorios como tos, odinofagia, congestión nasal o rinorrea, mialgias y cefalea, con frecuencia hay fatiga; y en raras ocasiones se presentan náusea, vómito, y diarrea. Generalmente, el cuadro se autolimita, empero en los ancianos con enfer-

Tabla I. Diferencias de los virus de influenza.

Género	A	B	C
Severidad de la enfermedad	+++	++	+
Frecuencia de aislamiento	+++	++	+
Reservorio humano	Sí	Sí	Sí
Reservorio animales	Sí	No	No
Tamaño (μm)	80 a 100	100 a 120	100 a 120
Glucoproteínas	HA y NA	HA y NA	HE
Aparición de subtipos	Sí	No	No
Segmentos de ARN	8	8	7
No. de genes	10	10	8

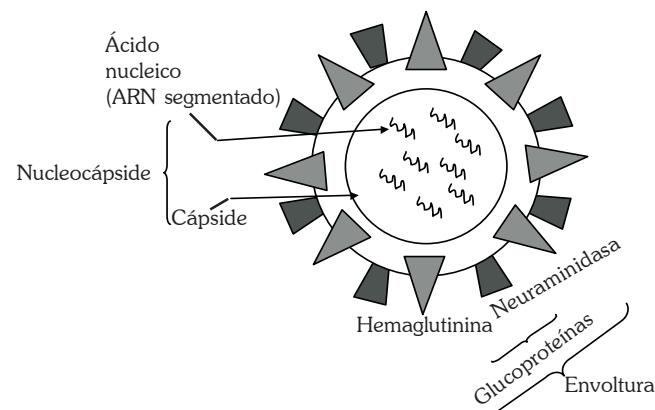


Figura 1. Representación esquemática del virus de influenza. Es un virus envuelto, los tipos A y B tienen 8 segmentos de ARN y el tipo C, tiene 7 segmentos que codifican diferentes proteínas, dos de las cuales no son estructurales (NS) y tres son proteínas transmembranales, dos de ellas son glucoproteínas: Hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).

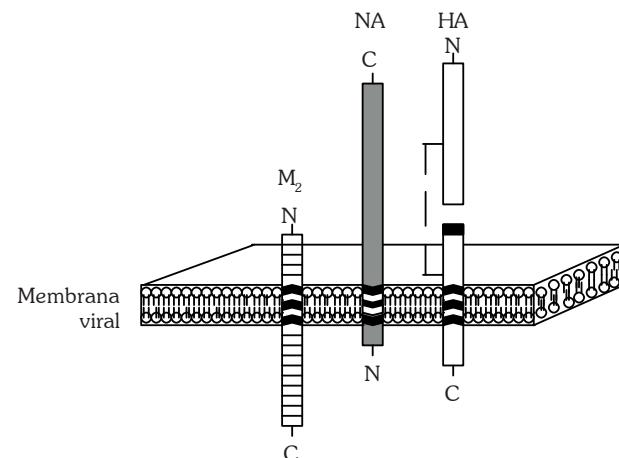


Figura 2. Modelo de la orientación y posición de las proteínas transmembranales HA, NA y M2 en la membrana del virus de la influenza. (Modificado de Lamb AR, Krug MR. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. In: Fields NB, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Rolezman B, Straus SS, editors. *Virology*. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 1353-1395).

medades crónicas respiratorias, cardíacas o renales se pueden generar complicaciones graves, neumonía, con riesgo de muerte^{5,12,14}.

PROPIEDADES DE LOS VIRUS

Los virus de influenza están constituidos por nucleocápside y envoltura (Figura 1). La nucleocápside está compuesta por el genoma viral, ARN y proteínas de empaquetamiento, nucleoproteínas. La envoltura está formada de una bicapa lipídica con composición similar a la membrana de la célula hospedera y tres proteínas transmembranales de superficie

(Figura 2) codificadas por el virus: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y la proteína M2. La HA es la proteína responsable de la unión al receptor celular y fusión de membranas²³⁻²⁵; la NA es una enzima que actúa sobre el receptor y participa en la liberación de partículas virales^{4,6,23,26}, y finalmente la proteína M2 forma un canal iónico²⁷⁻³⁰. La HA y NA son glucoproteínas que definen a los subtipos virales por diferencias antigenicas. Actualmente, se han identificado 15 subtipos de HA y 9 de NA³¹⁻³³.

El tamaño de los virus varía de 80 a 120 nm (Tabla I)⁶, tienen un genoma de ARN de cadena sencilla fragmentado, característica sobresaliente de esta familia^{5,31}. El número de fragmentos varía dependiendo del tipo: Influenza A y B tienen ocho fragmentos^{22,34}, y en cambio C, siete⁶. El ARN está empaquetado por una nucleoproteína, NP⁶. Los fragmentos de ARN tienen polaridad negativa, es decir no funciona como ARNm, requiere de la ARN polimerasa II celular, para la replicación de ARN de polaridad positiva, cadena codificante^{35,36}. Las partículas virales se enlazan a receptores celulares de superficie que contienen ácido siálico, componente que se encuentra en mucopolisacáridos y glucoproteínas de membranas celulares^{4,37,38}.

La nomenclatura para describir a estos virus es la siguiente: Género del virus A, B o C; huésped de origen (se omite si es el hombre), área geográfica de procedencia, número de cepa y año de aislamiento. Entre paréntesis se describen las glucoproteínas de superficie, con las letras H y N, y subíndice numérico que identifica al antígeno, ej. A/PR/8/34 (H1N1), virus de influenza A, aislado en Puerto Rico, cepa 8 aislada en 1934, hemaglutinina 1 y neuraminidasa 1. Las cepas prototipo de los subtipos de influenza A, aislados del hombre, son: A/PR/8/34 (H1N1), A/FM/1/47(H1N1), A/Japón/305/57 (H2N2), A/Hong Kong/1/68 (H3N2)⁴.

ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y PRODUCTOS PROTEICOS

El tamaño de los fragmentos de ARN varía de 890 a 2341 nucleótidos (Tabla II). Los segmentos del 1 al 6 codifican para un producto génico y los fragmentos 7 y 8 para dos, por lo tanto, el genoma de influenza A y B tiene información para 10 proteínas y 8 en influenza C (Tabla II)³⁵. Uno de los genes codifica para dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2, los productos de transcripción pueden ser detectados *in situ* en células infectadas, y las proteínas también, pero sin formar parte del virión. En la Tabla II, los fragmentos de ARN están ordenados de acuerdo a su peso molecular. Los fragmentos 1, 2 y 3 codifican para las proteínas P que de acuerdo a su naturaleza química se clasifican en básicas, PB, o ácidas, PA. Actualmente han sido descritas tres: PB1, PB2 y PA^{31,39-42} estas proteínas constituyen parte del complejo de la polimerasa, maquinaria requerida en la síntesis del ARN, son sintetizadas en el citoplasma de las células infectadas y transportadas posteriormente al núcleo. La relación numérica es de 30 a 60 moléculas de proteínas P por partícula viral³¹.

En el segmento 4 de ARN es codificada la hemaglutinina, llamada así por la capacidad que tiene para aglutinar eritrocitos. Esta proteína permite la unión al receptor celular por medio del ácido siálico e induce la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma⁴³. La HA es el antígeno principal al que se dirigen los anticuerpos neutralizantes^{23,44}; es sintetizada como un zimógeno HA₀, de aproximadamente 75 kDa y está asociada en trímeros, con uniones no covalentes. El zimógeno HA₀ es activado después de la traducción^{31,44} en dos etapas: 1) Activación proteolítica^{7,45-49} por una exopeptidasa en la arginina 329, para generar dos polipéptidos glucosilados, HA₁ y HA₂ constituidos por 329 y 221 a.a., respectivamente^{23,44}. Estos polipéptidos están

Tabla II. Proteínas del virus de influenza.

Segmento de ARN y No. de nucleótidos	Proteína	Nomenclatura de proteínas según tipo de virus			Número de aminoácidos	PM en kDa
		A	B	C		
1	2341	Polimerasa	PB2	PB1	759	96
2	2341	Polimerasa	PB1	PB2	757	87
3	2233	Polimerasa	PA	PA	716	85
4	1778	Hemaglutinina	HA	HA	566	75
5	1565	Nucleoproteína	NP	NP	498	50 - 60
6	1413	Neuraminidasa	NA	NA-NB	469	48 - 63
7	1027	Proteína de membrana	M1 M2 M3	M1 M2 NS1 NS2	252 97	60 15
8	890		NS1 NS2	NS1 NS2	230 121	25 12

PA- proteína P con naturaleza ácida

PB- proteína P con naturaleza básica

Los valores de aminoácidos y PM se presentan con base en el virus de influenza A.

unidos por un puente disulfuro entre la cisteína 14 de la cadena HA₁ y la cisteína 137 de HA₂ (Figura 3) y otros intercatenarios y 2) La liberación de HA₂ permite la exposición del péptido de fusión^{31,50,51,53}, dominio hidrofóbico de la región amino terminal, e inserción de la cadena polipeptídica a la bicapa lipídica del lumen del retículo endoplásmico. El corte de HA₀ y la distribución de las proteasas activan la infectividad de la HA en la célula hospedera, son los factores principales involucrados en el tropismo y en la capacidad de una infección sistémica. La HA tiene una conformación trimérica (Figura 4a) formada por una región fibrilar, tallo que une a dos regiones globulares, una grande y otra pequeña. La región carboxilo de HA₂ forma el glóbulo pequeño que participa en el anclaje de la proteína a la bicapa lipídica del virus, y la región amino terminal de HA₁ constituye el glóbulo grande, zona en la que están localizados los sitios de neutralización del virus^{23,44,52-54}. En cada partícula viral se encuentran aproximadamente 500 moléculas (170 trímeros) de HA³⁵. La conformación proteica expuesta de HA permite que sea un blanco accesible en la generación de variantes antigenicas.

En el fragmento 5 de ARN se encuentra el gen que codifica la nucleoproteína (NP), proteína que se expresa en cantidad mayor que las proteínas P³⁵, pero funcionan conjuntamente en la síntesis del material genético del virus. En el centro del virus, el ARN forma un complejo con las moléculas de NP. Por cada partícula viral hay alrededor de 1000 moléculas de la proteína NP; cada molécula de NP cubre aproximadamente 20 nucleótidos, empacando el ARN en una estructura helicoidal. Las NP protegen al genoma del medio ambiente y participan en la replicación^{55,56}.

El segmento 6 del ARN codifica la neuraminidasa (NA), glucoproteína, que se encuentra en la superficie de los virus de influenza A y B, pero no en C^{6,35}. La función de esta proteína es remover los residuos de ácido siálico enzimáticamente de la membrana en la célula infectada, permite la gemación de los viriones recién sintetizados y evita que estos se autoagreguen y así salgan libremente a infectar a otra célula⁵⁷. Esta enzima tiene actividad de esterasa y está constituida por una cadena polipeptídica de 469 a.a., con una región hidrofóbica en los aminoácidos del 7 al 35, anclada en la bicapa lipídica (Figuras 1 y 2). Estructuralmente

está formada por región tubular a la que se le llama tallo, y una globular (cabeza) ésta última constituida por cuatro subunidades (Figura 4b). El sitio de unión de la cabeza y tallo está localizado en los residuos 73 y 74 de la región amino terminal; la región entre los aminoácidos 36 al 73 forma el tallo y el resto la cabeza. Los sitios catalíticos son cuatro y se encuentran en la parte superior de cada subunidad. La NA presenta fenómenos de variabilidad genética por mutación y recombinación con alta frecuencia^{35,43,58}. La relación numérica entre partícula viral y NA es 1 a 100 (25 tretrámeros). En la pandemia de 1918, la NA actuó como molécula reclutadora de plasminógeno, que activó a la HA dándole un potencial infectivo sistémico⁵⁹.

Los fragmentos 7 de ARN de influenza A y B codifican proteínas de membrana, M1 y M2, y una secuencia que se transcribe (M3) aunque el producto de la traducción no ha sido identificado^{35,60,61}. En influenza C, el fragmento 6 es el que codifica la proteína de membrana M³⁵. La función de estas proteínas es estabilizar la envoltura durante la maduración del virus. En influenza A y B, el marco de lectura está sobrepuerto; la proteína M1 tiene el marco de lectura en el residuo 25 del terminal 5' del ARNm⁶¹ y el de M2 está localizado en el residuo 700 del 3' del extremo final del gen⁶². M1 está rodeando al núcleo viral y en mayor proporción, 3000 moléculas por virus y M2 es localizada en la membrana y tiene una proporción inferior, 20 a 60 moléculas por virión⁶³. El papel de M2 en la replicación viral no es preciso, sin embargo se ha sugerido que funciona como un canal iónico⁶²⁻⁶⁴ (Figura 2), que permite el paso de protones del endosoma hacia el interior del virión; el cambio de fuerza iónica participa en la separación del complejo ribonucleoproteína (RNP) y de M1. La RNP libre entra al núcleo e inicia la replicación y transcripción viral⁶²⁻⁶⁴.

En influenza A y B, el segmento 8 y en C el 7 codifican secuencias que no son proteínas estructurales, NS1 y NS2⁶⁴⁻⁶⁶. La función no es del todo conocida, no obstante se sugiere que participan en la síntesis del ARN viral. Algunos investigadores⁶⁵⁻⁶⁷ han demostrado la localización de agregados internucleares durante la síntesis de ARN, no detectados en el virión y al parecer NS1 está implicada en el procesamiento del pre-ARNm e interactúa con proteínas del metabolismo celular de células infectadas⁶⁷.

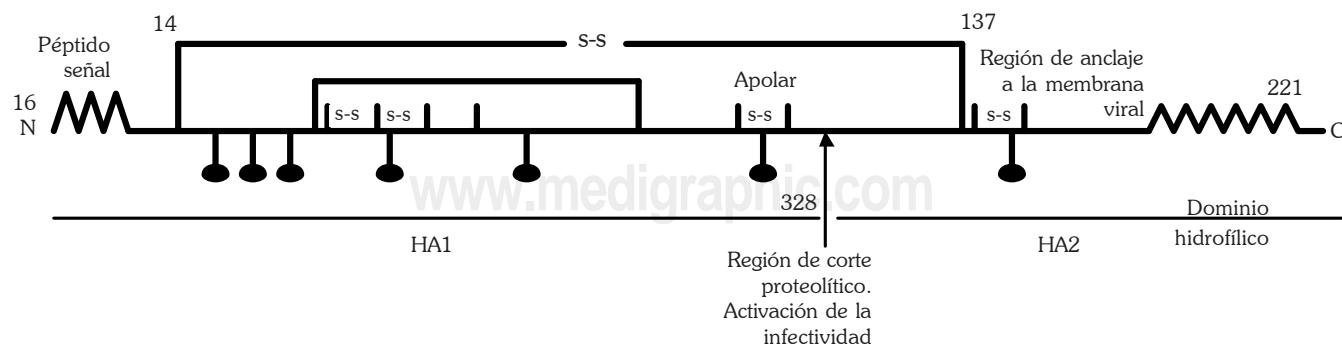


Figura 3. Estructura primaria la hemaglutinina. La proteína debe de ser activada por una proteasa que la corta en HA1 y HA2, las dos regiones se mantienen unidas por puentes disulfuro. La estructura tiene varios sitios para la unión de carbohidratos (círculos negros).

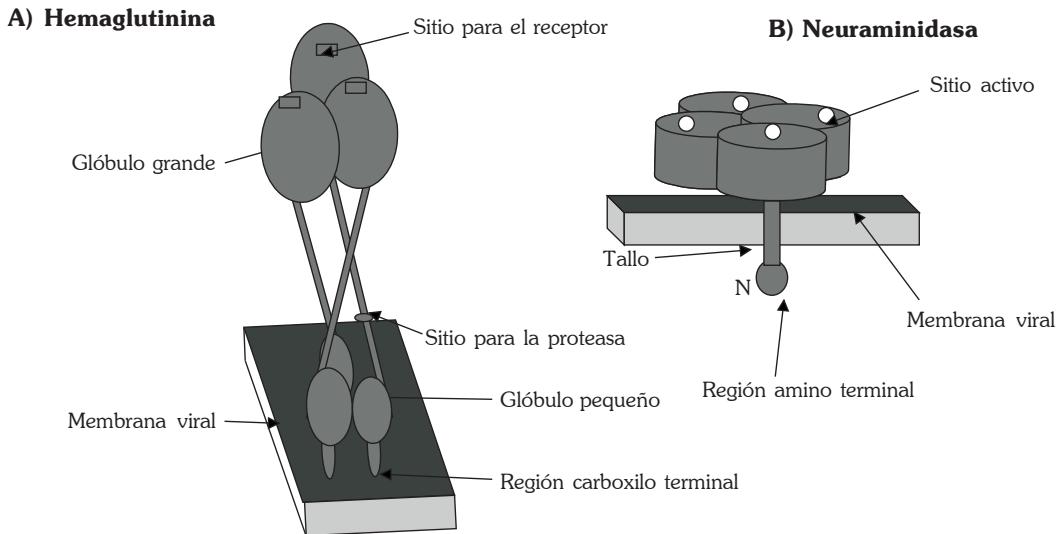


Figura 4. Representación de las glucoproteínas de influenza. En las células infectadas y en los viriones la hemaglutinina (HA) se encuentra como trímero y la neuraminidasa (NA) como tetrámero; **A)** La HA que está constituida por globulos grandes y pequeños. En los grandes se encuentran los sitios para la unión con el receptor celular y son los sitios donde se presenta el mayor número de variación antigenica; los pequeños corresponden a la región carboxilo de la molécula y es la región por la cual se ancla a la membrana viral; **B)** La NA, es una enzima, formada por cabeza y tallo; en la cabeza se encuentran los cuatro sitios activos de la enzima; el tallo corresponde a la región amino. A diferencia de la HA la NA se ancla al virus por la región amino.

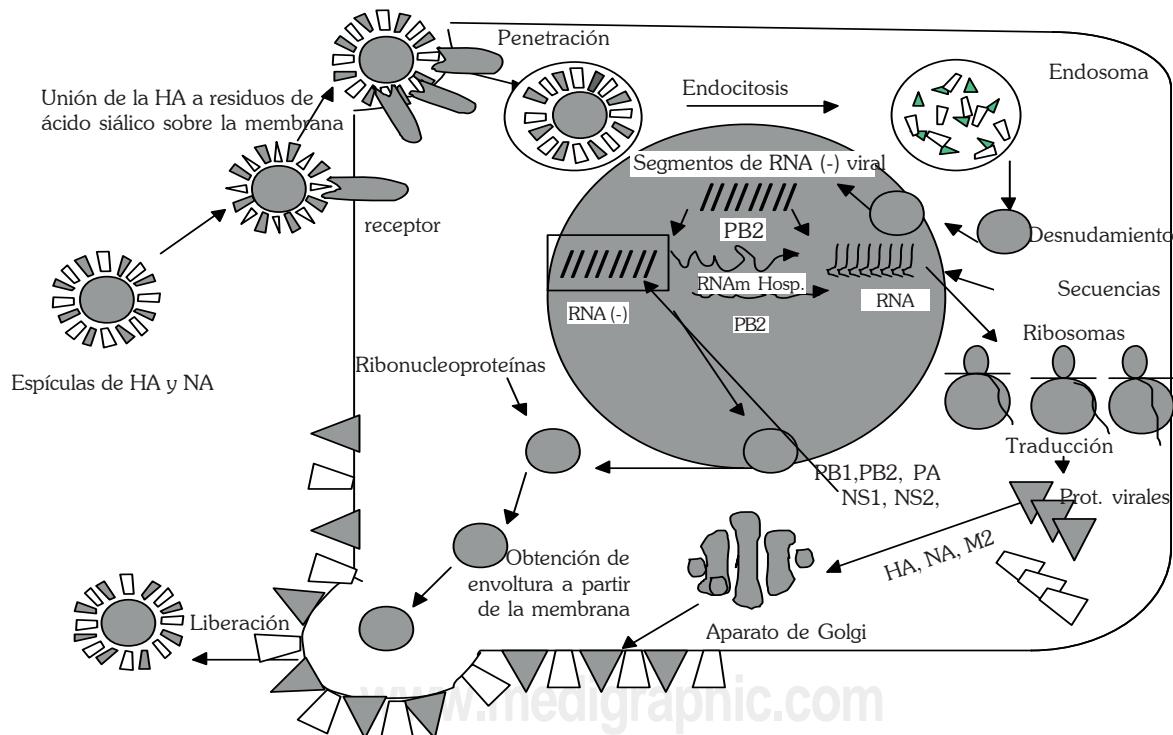


Figura 5. Ciclo de replicación del virus de influenza. El virus se une a receptores celulares por medio de la HA; entra por endocitosis. El pH en el endosoma es de suma importancia para que prosiga el ciclo. El genoma de ARN segmentado de polaridad negativa se sintetiza en el núcleo, realizándose dos tipos de transcripciones, una para ARNm poladenilado y otra para la síntesis del ARN genómico de polaridad negativa. La síntesis de proteínas se realiza en el citoplasma y las proteínas P, NS y M1 migran al núcleo celular; luego estas proteínas migran nuevamente al citoplasma para unirse con las proteínas HA, NA y M2 que permanecen todo el tiempo en el citoplasma, se ensamblan, maduran y finalmente se da la liberación de las partículas. En este paso es importante la participación de la NA.

REPLICACIÓN VIRAL

En el ciclo de replicación de influenza están establecidos diversos eventos (Figura 5)³:

Adsorción. Unión del virus por medio de la HA al receptor de ácido siálico de la célula^{4,68,69}, lo cual es restringido por rango de hospedero⁷⁰.

Penetración. La partícula vírica es introducida por un proceso de endocitosis mediada por receptores. La HA induce la fusión de la cubierta viral con la membrana del endosoma y liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma^{26,51,69}. En este evento la HA sufre una activación bifásica: 1) corte de la HA₀ por una proteasa⁷¹, en HA₁ y HA₂, la actividad proteolítica permite que HA sea susceptible a un cambio conformacional, de un pH bajo del endosoma asociado a la acción de M2, al formar un canal iónico^{4,44,54}; y 2) la exposición de un dominio hidrofóbico de HA₂ que interacciona con la bicapa lipídica de la membrana blanco^{26,51}. Actualmente, es conocido que el corte de HA es un factor importante en la patogenicidad²³.

Replicación y síntesis de proteínas. Como se mencionó, el ARN viral es de polaridad negativa^{16,72} por lo tanto requiere de la polimerasa II del hospedero para sintetizar la molécula de ARNm traducible o de polaridad positiva, este ARNm se traduce en las proteínas virales. Por otro lado, el virus requiere la presencia de una replicasa y la cooperación de PB2 y NP para sintetizar el ARN de polaridad negativa, genoma viral^{23,35,39,73}. Así, durante la infección viral se realizan dos tipos de transcripción: 1) transcripciones a ARNm, poliadeniladas, molécula traducible; 2) transcripciones completas no poliadeniladas, ARN genómico (Figura 6)³⁵, este evento será revisado más adelante. En las primeras horas de la infección, en el citoplasma de la célula huésped hay una gran cantidad de ARNm de las proteínas virales, una vez sintetizadas las proteínas P, NS1, NS2 y M1 migran al núcleo (Figura 5) para la síntesis del ARN genómico junto con la replicasa^{4,30,61,73,74}.

Maduración, ensamblaje y liberación. Posteriormente el ARN genómico junto con las proteínas NP se desplazan hacia el citoplasma, las proteínas HA, NA y M2 permanecen todo el tiempo en el citoplasma^{4,6} (Figura 5). En la maduración del virus, la proteína M2 podría funcionar como señal inicial de ensamblaje al dirigir la migración de los componentes virales hacia la membrana, proceso que ocurre entre 4 ó 5 h de la infección^{35,60-63}. La incorporación de la proteína M2 produce un aumento del grosor de la membrana. Park y col⁶² proponen una interacción entre las proteínas de superficie HA, NA y M2 (Figura 7). La proteína M2 tiene regiones que le permiten incorporarse a la membrana en región extracelular. La concentración de M2 está en cantidades inferiores con respecto a HA y NA, pero con concentración adecuada para formar el complejo de incorporación^{52,55}, el aumento de M2 podría causar una acidificación alta que afectaría este proceso. La regulación de la incorporación y ensamblaje de los componentes virales es desconocida, empero debe de existir un mecanismo que organice y controle el ensamblaje perfecto de cada componente, papel donde podría participar M2⁵². En la liberación del virus, la NA es la encargada de eliminar residuos de ácido siálico y permitir la salida libre de

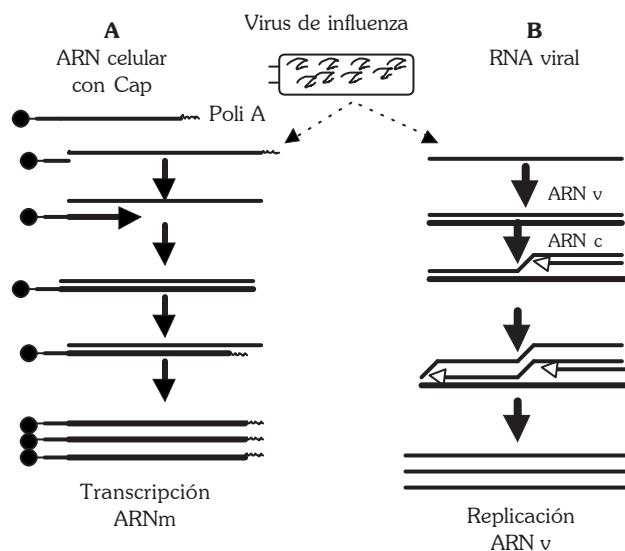


Figura 6. Transcripción y replicación del virus de influenza:
A) Durante la transcripción la ARN polimerasa viral cataliza el corte del cap del ARNm y los utiliza para la síntesis del ARNm viral;
B) para la replicación del genoma viral, se realizan transcripciones no-poliadeniladas.

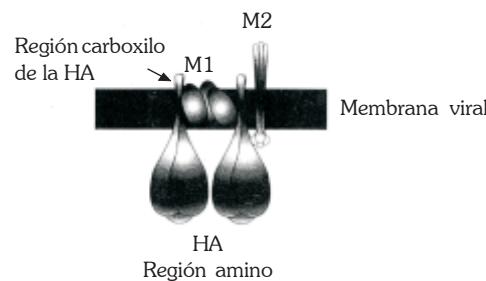


Figura 7. Modelo de la interacción de las proteínas transmembranales del virus de influenza, propuesto por Park y col. En la parte externa M2 interacciona con HA y es posible que también con la NA. En la región transmembranal M1 pudiera facilitar la interacción entre moléculas de HA.
(Modificado de: Park EK, Castrucci M, Portner A, Kawaoka Y. *The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions.* J Virol 1998; 72: 2449-2455.)

los viriones sin que se agreguen. Estudios *in vitro* han demostrado⁵⁷, que el cambio de un simple aminoácido en el sitio activo de la enzima puede alterar su función⁵⁹.

Transcripción

El virus de influenza no es capaz de iniciar la síntesis de ARNm ni de modificar el extremo 5' final en la molécula de ARNm por Cap y metilación⁷², por lo que requiere la participación de la ARN polimerasa II celular para la generación del ARNm requerido, por medio de la síntesis de una secuencia líder del ADN celular. Esta secuencia debe tener tanto Cap como un sitio de metilación en guanina en posición 7 (G7met)^{35,75}. El ARNm generado en la célula del huésped es cortado por una

endonucleasa codificada por el virus⁷⁶. La secuencia de corte está localizada entre los nucleótidos del 10 al 13 del Cap y funciona como molde para iniciar el evento (Figura 6)^{35,41,42}. El sitio de corte es un residuo de adenina en posición 3' y es adicionado un uracilo al final de la cadena 3'. Posteriormente, es adicionada una guanina mediada por la transcripción viral de la primera y penúltima base del templado del ARN viral^{35,75,76}, que es un residuo de citosina. El crecimiento del transcripto es realizado por la transcriptasa viral, y el sitio de paro está entre los nucleótidos 15-22 de la región final del templado con poli A en el 3'^{35,76,77}.

En la transcripción, las proteínas P actúan como un complejo que se desplaza a lo largo de la cadena en crecimiento^{6,35,77,78}, PB2 se une a los nucleótidos del Cap y PB1^{35,75} al primer residuo de guanina que es adicionado. De esta manera, PB1 puede contener el sitio activo para la elongación de la cadena. La función de PA no está definida, pero se encuentra localizada también en el complejo de transcripción funcional (Figura 8)^{35,40,66,72}.

VARIACIÓN ANTIGÉNICA

La naturaleza del genoma segmentado, permite el intercambio de información genética durante la infección mixta de células con diferentes virus que pueden provenir de especies de animales diferentes o del hombre. Los virus presentan diversos tipos de variaciones antigenicas, entre ellas:

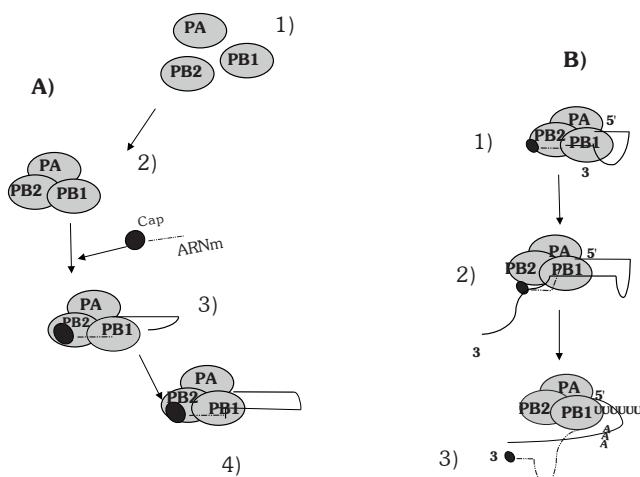


Figura 8. Modelo para esquematizar el movimiento y ensamblaje de la polimerasa viral formada por las proteínas P:

A.- 1) y 2) Las proteínas PB1, PB2, PA, se ensamblan en un complejo inactivo; 3) El cap cortado al ARNm celular se une a PB2, con lo que la actividad de endonucleasa del complejo se enciende; PB1 contiene el primer residuo de G, lo que ocasiona el movimiento de la cadena; 4) las cadenas tanto para el ARNm como para el ARN viral van creciendo y las tres proteínas se mueven en el complejo. **B.-** El complejo ya maduro inicia la transcripción generalmente en la penúltima base. El final 5' del ARN permanece fuertemente unido a la polimerasa y el cap que inicialmente se encontraba unido a PB2, pero conforme avanza la elongación se va separando. Finalmente, la terminación llega cuando se da la poliadenilación de la cadena.

1. La variación menor o desviación antigenica (deriva antigenica) son cambios en los epitopes de las glucoproteínas HA y NA^{12,32,79}, surgen por selección de mutantes con alta frecuencia; **2.** la segunda variación antigenica es el desplazamiento o cambio antigenico, ocurre rara vez y da origen a la aparición de nuevas cepas, con antígenos de superficie diferentes a los ya existentes⁷⁹. Estos cambios pueden presentarse principalmente en la HA o en ambas glucoproteínas^{10,23,50,58}, sin descartar alteraciones en otras proteínas del virus⁸⁰. La pérdida o falta de sitios de glucosilación en la HA pueden afectar el pH de fusión³⁸, lo cual altera la especificidad del receptor, repercutiendo en la virulencia de una cepa⁸⁰. Además de los cambios en HA y NA⁸⁰, sugiere que cambios en la secuencia del gen que codifica para M afectan la asociación-disociación de la proteína M1 de la ribonucleoproteína dependiente del pH, así como el control de la virulencia y la multiplicación. Desde 1933, los virus de influenza A han presentado cuatro desplazamientos antigenicos importantes, originados por recombinación entre cepas humanas y de animales^{12,13,81-84}, cada variante nueva estuvo caracterizada por la modificación de antígenos preexistentes dando lugar a subtipos. Todos los subtipos circulan en aves domésticas y silvestres que funcionan como reservorios, en estos animales las infecciones están localizadas generalmente en el intestino y altas concentraciones de virus son eliminadas en las heces, sin causar enfermedad^{3,5,79}, el estudio de cepas virales aisladas de estas aves indican que hay un equilibrio con el hospedero⁷⁰. Por otro lado se considera que el cerdo puede ser el animal en el que las cepas virales de origen aviario sufren una adaptación para poder infectar a otras especies animales⁸⁵. Durante años los subtipos de virus con H₁, H₂ y H₃ han circulado en humanos y sólo en número limitado de subtipos aislados de otras especies de mamíferos como H₁, H₃ y H₉ en cerdos y H₃ y H₇ en caballos, pero cuando un virus originado en una especie animal entra en otra especie diferente de hospedero, el virus sufre una rápida evolución^{83,85}. Sin embargo, el significado de la capacidad de influenza A para replicar en humanos y la patogenicidad del virus aún es un enigma. En México en 1993 se identificó el virus con el subtipo H₅, rastreando al virus⁸⁶⁻⁸⁸ se supo que el subtipo se originó en Asia y de ahí pasó a E.U.A. y de ahí a su vez a México. Se considera que el virus tuvo su origen en Hong Kong y que es posible que representó la fuente para las infecciones en humanos. Afortunadamente, la infección de humano a humano fue muy limitada por ese tiempo, pero en los pocos casos que esto sucedió se desconoce el mecanismo, sin embargo se cree que en parte, la especificidad del receptor estuvo involucrada, ya que se sabe que este subtipo viral tiene preferencia por un receptor que contenga uniones alfa^{2,3} de ácido siálico que está presente preferentemente en especies aviaras¹².

Una característica peculiar en la infección por este virus, es que, en los individuos infectados las sucesivas exposiciones a los virus de influenza A, tanto si es por infección natural o por inmunización artificial, la respuesta de anticuerpos va dirigida principalmente a los antígenos de la cepa viral inicial, a este fenómeno se le llama "La doctrina del pecado"

antigénico original”⁵. Así por ejemplo, una persona que en la niñez fue infectada con el virus H₀N₁ y posteriormente H₁N₁ la respuesta de sus anticuerpos será mayor hacia H₀N₁ aun cuando desarrolle anticuerpos para H₁N₁. No obstante, en el caso de H₂N₂, al parecer ignora esta doctrina.

COMENTARIOS

¿Se presentará otra pandemia de influenza?

Una de las características del virus de influenza en el humano es que, cuando un nuevo subtipo del virus aparece y causa una pandemia, el subtipo que circulaba previamente, desaparece. Así en 1918 el virus H₁N₁ circulaba y fue sustituido al entrar el subtipo H₂N₂ en 1957 y en 1968 aparece el subtipo H₃N₂ y luego, en 1977 después de 20 años de ausencia del virus H₁N₁ en el humano, vuelve a aparecer.

En la actualidad hay por lo menos 15 serotipos de HA del virus de influenza A, pero la inmunidad de la población humana es limitada por no más a tres de estos serotipos. La posibilidad de erradicar al virus es lejana, debido a que existe un amplio número de hospederos animales que actúan como reservorio para el virus. Para limitar la infección, la vacunación podría ser el medio adecuado, la obtención de vacunas génicas o de ingeniería genética pueden ser la solución en un futuro. Empero, hay que recordar que el virus de influenza A además de contar con un amplio número de reservorios, también se transmite de una especie a otra con alta frecuencia y que así, los virus humanos y aviaros pueden infectar a otros animales como el cerdo y el caballo; de tal manera que, los virus pueden recombinarse fácilmente en la naturaleza y por los cambios genéticos del virus, aún siendo de origen aviar o de cerdo, puede adquirir la capacidad de reconocer receptores en células humanas. Todo esto limita el éxito de una vacuna y por lo tanto, resulta difícil controlar la aparición de una nueva variante viral. Tomando en cuenta que una de las últimas pandemias fue en 1989, y considerando que el virus sufre un rearrreglo genético cada 10 a 20 años, es probable que estemos próximos a una pandemia.

Se especula si la próxima pandemia será originada por un virus que resulte de un rearrreglo entre un virus de origen humano y otro de origen aviar. Por lo anterior, en granjas donde se manejan aves y de manera especial, en los lugares que se deduce se han originado las pandemias pasadas como lo son los países asiáticos, se recomienda extremar las medidas de control como: campañas de vacunación, aislamiento de animales enfermos, diagnóstico dirigido del virus en pacientes con infección respiratoria aguda, capacitación de personal médico y paramédico para diagnosticar la infección en etapas iniciales e intensificar las campañas de prevención.

Así influenza es el paradigma de una enfermedad viral en la cual la evolución continua del virus es de gran importancia para que origine las epidemias anuales y las pandemias ocasionales.

REFERENCIAS

1. Monto AS, Iacuzio DA, Montagne JR. *Pandemic influenza-confronting a reemergent threat*. J Infect Dis 1997; 176 (1 Suppl): 1S-3S.
2. Hampson AW. *Surveillance for pandemic influenza*. J Infect Dis 1997; 176 (1 Suppl): 8S-13S.
3. Webster RG. *Predictions for future human influenza pandemics*. J Infect Dis 1997; 176 (1 Suppl): 14S-19S.
4. Lamb AR, Krug MR. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. In: Fields NB, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Rolezman B, Straus SS, editors. *Virology*. Vol. 1. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 1353-1395.
5. Murphy RB, Webster RG. *Orthomyxoviruses*. In: Fields NB, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Rolezman B, Straus SS, editors. *Virology*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 1397-1445.
6. Lamb AR, Choppin WP. *The gene structure and replication of influenza virus*. Ann Rev Biochem 1983; 52: 467-506.
7. Morsy J, Garten W, Rott R. *Activation of an influenza virus A/Turkey/Oregon/71 HA insertion variant by the subtilisin-like endoprotease furin*. Virology 1994; 202: 988-991.
8. Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, et al. *Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness*. Science 1998; 279: 393-396.
9. Murphy FA. *Virus taxonomy*. In: Fields NB, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Rolezman B, Straus SS, editors. *Virology*. Vol 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 1397-1445.
10. Taubenberger JK, Reid AH, Kraft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. *Initial genetic characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus*. Science 1997; 275: 1793-1796.
11. Brown IH, Ludwig S, Olsen CW, Hannoun C, Scholtissek C, Hinshaw VS, et al. *Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs*. J Gen Virol 1997; 78: 553-562.
12. Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster RG. *The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties*. J Virol 1999; 73: 1146-1155.
13. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. *European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic?* Virology 1995; 212: 555-561.
14. Claas EC, Osterhaus A, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, et al. *Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus*. Lancet 1998; 351: 472-477.
15. Shortridge KF. *The next pandemic influenza virus?* Lancet 1995; 346: 1210-1212.
16. Palese P, Yamashita M. *Evolutionary lineages and molecular epidemiology of influenza A, B and C viruses*. In: Kurstak E, Marusyk R, Murphy FA, Van Regenmortel MHV, editors. *Applied virology research. Virus variability, epidemiology, and control*. Vol. 2. New York: Plenum Publishing, 1990: 119-129.
17. Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, Ortín J, et al. *Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP peptides interfere with initiation step of viral mRNA synthesis in vitro*. J Virol 1994; 68: 6900-6909.
18. Crowe J. *Host responses to respiratory virus infection and immunization*. Curr Top Microbiol Immunol 1999; 236: 191-214.
19. Tamura M, Saikh KU, Kurane I, Ennis FA. *Immunization with the N-terminal region of the nonstructural protein NS1 promotes survival after challenge with lethal influenza A virus dose*. Viral Immunol 1998; 11: 131-135.
20. Powers DC, McElhaney JE, Florendo OA, Manning MC, Upshaw CM, Bentley DW, et al. *Humoral and cellular respon-*

- ses following vaccination with purified recombinant hemagglutinin from influenza A (H3N2) virus.* J Infect Dis 1997; 175: 342-351.
21. El-Madhu AS, Cox RJ, Soreide A, Olofsson J, Haaheim LR. *Systemic and mucosal immune responses in young children and adults after parenteral influenza vaccination.* J Infect Dis 1998; 178: 933-939.
 22. Lee YS, Seong BL. *Nucleotides in the panhandle structure of the influenza B virus virion RNA are involved in the specificity between influenza A and B viruses.* J Gen Virol 1998; 79: 673-681.
 23. Garten W, Klenk HD. *Understanding influenza virus pathogenicity.* Trends Microbiol 1999; 7: 99-100.
 24. Grassauer A, Egorov YA, Ferko B, Romanova I, Katinger H, Muster T. *A host restriction-based selection system for influenza haemagglutinin transfected viruses.* J Gen Virol 1998; 79: 1405-1409.
 25. Schulze IT. *Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin.* J Infect Dis 1997; 176 (1 Suppl): 24S-28S.
 26. Enami M, Palase P. *High-efficiency formation of influenza virus transfectants.* J Virol 1991; 65: 2711-2713.
 27. Hugshon FM. *Structural characterization of viral fusion proteins.* Curr Biol 1995; 5: 265-274.
 28. White JM, Wilson IA. *Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: low-pH activation of the influenza virus hemagglutinin.* J Cell Biol 1981; 105: 2887-2896.
 29. Steinhauer DA, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC. *Studies of the membrane fusion activities of fusion peptide mutants of influenza virus hemagglutinin.* J Virol 1995; 69: 6643-6651.
 30. Fischer C, Schroth-Diez B, Herrmann A, Garten W, Klenk HD. *Acylation of the influenza hemagglutinin modulates fusion activity.* Virology 1998; 248: 284-294.
 31. Steinhauer DA. *Role de hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus.* Virology 1999; 258: 1-20.
 32. Webster R, Bean WJ, Gorman OT, Chanberstn Kawaoka Y. *Evolution and ecology of influenza A viruses.* Microbiol Rev 1992; 56: 152-179.
 33. Röhm C, Zhou N, Süss J, Mackenzie J, Webster RG. *Characterization of a novel influenza hemagglutinin H15: criteria for determination of influenza A subtypes.* Virology 1996; 217: 508-516.
 34. Pritlove DC, Poon LM, Fodor E, Sharps J, Brownlee GG. *Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences.* J Virol 1998; 72: 1280-1286.
 35. Ishihama A, Nagata K. *Viral RNA polymerases.* Crit Rev Biochem 1988; 23: 27-76.
 36. Masunaga K, Mizumoto K, Kato H, Ishihama A, Toyoda T. *Molecular mapping of influenza virus RNA polymerase by site-specific antibodies.* Virology 1999; 256: 130-141.
 37. Gambaryan AS, Marinina VF, Tuzikov AB, Bovin NV, Rudneva IA, Sinitisyn BV, et al. *Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties of H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs.* Virology 1998; 247: 170-177.
 38. Davies P, Barry RD. *Nucleic acid of influenza virus.* Nature 1966; 211: 384-387.
 39. Subbarao EK, Kawaoka Y, Murphy BR. *Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature-sensitive and attenuating mutation.* J Virol 1993; 67: 7723-7728.
 40. González S, Ortín J. *Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain.* J Virol 1999; 73: 631-637.
 41. Honda A, Mukaigawa J, Yokoyama A, Kato A, Ueda S, Nagata K, et al. *Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8.* J Biochem 1990; 107: 624-628.
 42. Honda A, Ishihama A. *The molecular anatomy of influenza virus RNA polymerase.* J Biol Chem 1997; 378: 483-488.
 43. Kendal AP, Cox NJ, Harman MW. *Antigenic and genetic variation of A(H1N1) viruses.* In: Kurstak E, Marusyk RG, Murphy FA, Van Regenmortel MHV, editors. *Virus variability, epidemiology, and control.* Plenum Medical Book Company, New York, London: Plenum Medical Book, 1990: 131-157.
 44. Klenk HD, Garten W. *Host cell proteases controlling virus pathogenicity.* Trends Microbiol 1994; 2: 39-43.
 45. Orlich M, Rott R. *Thermolysin activation mutants with changes in the fusogenic region of an influenza virus hemagglutinin.* J Virol 1994; 68: 7537-7539.
 46. Orlich M, Linder D, Rott R. *Trypsin-resistant protease activation mutants of an influenza virus.* J Gen Virol 1995; 76: 625-633.
 47. Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M. *Influenza viruses, cell enzymes and pathogenicity.* Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 16-S19.
 48. Ohuchi R, Ohuchi M, Garten W, Klenk HD. *Human influenza virus hemagglutinin with high sensitivity to proteolytic activation.* J Virol 1991; 65: 3530-3537.
 49. Lazarowitz SG, Choppin PW. *Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide.* Virology 1975; 68: 440-454.
 50. Daniels RS, Downie JC, Hay AJ, Knossow M, Skelhel JJ, Wang ML, et al. *Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein.* Cell 1985; 40: 431-439.
 51. Bullough PA, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. 1994. *The structure of influenza hemagglutinin at the pH of membrane fusion.* Nature 371: 37-43.
 52. Bizebard T, Gigant B, Rigolet P, Rasmussen B, Diat O, Bösecke P, et al. *Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody.* Nature 1995; 376: 92-94.
 53. Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. *Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation.* Cell 1998; 95: 409-417.
 54. Vanlandschoot P, Beirnaert E, Barrère B, Calder L, Millar B, Wharton S, et al. *An antibody which binds to the membrane proximal end of influenza virus haemagglutinin (H3 subtype) inhibits the low pH-induced conformational change and cell-cell fusion but does not neutralize virus.* J Gen Virol 1998; 79: 1781-1791.
 55. Horimoto T, Kawaokay. *Reverse genetic provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus.* J Virol 1994; 68: 3120-3128.
 56. Albo C, Valencia A, Portela A. *Identification of an RNA binding region with the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein.* J Virol 1995; 69: 3799-3806.
 57. Lee KH, Seong BL. *The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens.* J Gen Virol 1998; 79: 1923-1934.
 58. McKimm-Breschkin JL, Sahasrabudhe A, Blick TJ, McDonald M, Colman PM, Hart GJ, et al. *Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site*

- decreases sensitivity to Neu5Ac2en-derived inhibitors.* J Virol 1998; 72: 2456-2462.
59. Goto H, Kawaoka Y. *A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus.* Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 10224-10228.
60. Hongo S, Sugawara K, Muraki Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Kitame F, et al. *Influenza C virus CM2 protein is produced from a 374-amino-acid protein (P42) by signal peptidase cleavage.* J Virol 1999; 73 : 46-50.
61. Briedis D, Lamb RA, Choppin WP. *Sequence of RNA segment 7 of the influenza B virus genome: partial amino acid homology between the membrane proteins (M₁) of influenza A and B viruses and conservation of a second open reading frame.* Virology 1982; 116: 581-588.
62. Park EK, Castrucci M, Portner A, Kawaoka Y. *The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions.* J Virol 1998; 72: 2449-2455.
63. Odagiri T, Tashiro M. *Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step.* J Virol 1997; 71: 2138-2145.
64. Sakaguchi T, Tu Q, Pinto LH, Lamb RA. *The active oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is a tetramer.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 5000-5005.
65. Wolff T, O'Neill RE, Palese P. *NS1-binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells.* J Virol 1998; 72: 7170-7180.
66. Greenspan D, Krystal M, Nakada S, Arnheiter H, Lyles DS, Palese P. *Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells.* J Virol 1985; 54 : 833-843.
67. Wolff T, O'Neill RE, Palese P. *Interaction cloning of NS-1, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses.* J Virol 1996; 70: 5363-5372.
68. Plotch ST, O'Hara B, Morin J, Palant O, La Rocque J, Bloom JD, et al. *Inhibition of influenza A virus replication by compounds interfering with the fusogenic function of the viral hemagglutinin.* J Virol 1999; 73: 140-151.
69. Laeeq S, Smith CA, Wagner SD, Thomas DB. *Preferential selection of receptor-binding variants of influenza virus hemagglutinin by the neutralizing antibody repertoire of transgenic mice expressing a human immunoglobulin μ minigene.* J Virol 1997; 71: 2600-2605.
70. Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y. *The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction.* J Virol 1998; 72: 7626-7631.
71. Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutome A, et al. *Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial clara cells.* J Biol Chem 1992; 267: 13573-13579.
72. Li X, Palese P. *Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA.* J Virol 1994; 68: 1245-1249.
73. Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortín J, Arrese M, et al. *Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication.* J Virol 1999; 73: 1186-1194.
74. Colacino JM, Laver GW, Air GM. *Selection of influenza A and B viruses for resistance to 4-guanidino-neu5 Ac2en in cell culture.* J Infect Dis 1997; 176 (1 Suppl): 66S-68S.
75. Plotch S, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM. *A unique Cap(m⁷GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription.* Cell 1981; 23: 847-858.
76. Kawakami K, Mizumoto K, Ishihama A. *RNA polymerase of influenza virus. IV. Catalytic properties of the capped RNA endonuclease associated with the RNA polymerase.* Nucleic Acids Res 1983; 11: 3637-3639.
77. Skehel JJ, Hay AJ. *Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza viral RNAs and their transcript.* Nucleic Acids Res 1978; 4: 1207-1219.
78. Webster R. *Influenza.* In: Morse SS, editor. *Emerging viruses.* New York: Oxford University Press, 1993: 37-45.
79. Gorman OT, Bean WJ, Webster RG. *Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis.* Curr Top Microbiol Immunol 1992; 176: 75-97.
80. Ward AC. *Virulence of influenza A virus.* Virus Genes 1997; 14: 187-194.
81. Kawaoka Y, Gorman OT, Ito T, Wells K, Donis RO, Castrucci MR, et al. *Influence of host species on the evolution of the nonstructural (NS) gene of influenza A viruses.* Virus Res 1998; 55: 143-156.
82. Murphy BR, Sly DL, Tierney E, Hosier NT, Massicot JG, London WT, et al. *Reassortant virus derived from avian and human influenzas A viruses is attenuated and immunogenic in monkeys.* Science 1982; 218: 1330-1332.
83. Bean WJ, Schell M, Katz J, Kawaoka Y, Naeve C, Gorman O, et al. *Evolution of H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman host.* J Virol 1992; 66: 1129-1138.
84. Ito T, Nelson J, Couceiro SS, Kelm S, Baum LG, Krauss S, et al. *Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential.* J Virol 1998; 72: 7367-7373.
85. Hirimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, et al. *Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico.* Virology 1995; 213: 223-230.
86. Perdue ML, García M, Beck J, Brugh M, Swaine DE. *An arginine insertion at the hemagglutinin cleavage site of an H5N2 avian influenza isolate.* Virus Genes 1996; 12: 77-84.
87. Perdue ML, García M, Senne D, Faire M. *Virulence associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses.* Virus Res 1997; 49: 173-186.
88. Palese P. *The genes of influenza virus.* Cell 1977; 10: 1-10.