

**ANÁLISIS DEL GENOMA DE INFLUENZA AVIAR H7N3 DE LA
EPIZOOTIA 2012-2015 EN MÉXICO**

PAULA ANDREA FIGUEROA VARELA

**PREGRADO DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE CIENCIAS**



MEDELLÍN, 12 DE MAYO DE 2017

**ANÁLISIS DEL GENOMA DE INFLUENZA AVIAR H7N3 DE LA
EPIZOOTIA 2012-2015 EN MÉXICO**

PAULA ANDREA FIGUEROA VARELA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título
de
BIÓLOGO**

**Director: JESUS MARTINEZ BARNETCHE
MEDELLÍN
UNIVERSIDAD EAFIT
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE CIENCIAS**

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Medellín, 12 de abril de 2017

AGRADECIMIENTOS

A la universidad EAFIT por su apoyo mediante la pasantía que ejecuté en el Instituto de Salud Pública de México, en donde logré desarrollar los objetivos de este trabajo propuesto.

Agradecimientos al Doctor Jesús Martínez Barnetche por su constante y valiosa asesoría y también al laboratorio 1 Planta baja del CISEI que me acogió durante el desarrollo de mi trabajo de grado como a su vez al Instituto Nacional de Salud Pública de México que me presto sus instalaciones en calidad de estudiante para ejecutar mi trabajo de grado.

Finalmente, y no menos importante al semillero de biología computacional de la universidad EAFIT por sus significativos aportes en lo que respecta a análisis filogenéticos y bioinformática.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme y ayudarme a lograr mis metas y a mi Familia porque siempre me han brindaron apoyo y amor, gracias a ellos por colaborarme durante mi universidad y siempre.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9-10
JUSTIFICACIÓN	11-12
OBJETIVOS	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
ESTADO DEL ARTE	14-24
ANTECEDENTES	14
COMPOSICIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA.....	14-17
CICLO DE REPLICACIÓN.....	17-18
MUTACIONES DEL VIRUS	18-20
RECOMBINACIÓN RNA.....	20
ANTIGENICIDAD.....	20-21
VIRUS DE LA INFLUENZA EN AVES DOMÉSTICAS	21-22
VIRUS DE LA INFLUENZA EN HUMANOS	23-24
METODOLOGÍA	25-29
RESULTADOS	30-65
METRICAS PARA CADA AISLADO	31-36
MUTACIONES.....	37-42
MODELOS TRIDIMENSIONALES	42-43
MODELOS TRIDIMENSIONALES CON MUTACIONES MAPEADAS	43-49
ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	50-58
MAPA DE SIMILITUD DE SECUENCIA.....	59-62
SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN.....	62-63
SELECCIÓN.....	63-65
ANÁLISIS DE RESULTADOS	66-73
CONCLUSIONES	74-75
REFERENCIAS	76-84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Costo estimado de algunos brotes de HPAI que han ocurrido en la industria aviar	12
Tabla 2. Brotes de influenza de los subtipos H5 y H7	22
Tabla 3. Métricas aislado 1	31
Tabla 4. Métricas aislado 2	31
Tabla 5. Métricas aislado 3	32
Tabla 6. Métricas aislado 4	32
Tabla 7. Métricas aislado 5	33
Tabla 8. Métricas aislado 6	34
Tabla 9. Métricas aislado 7	34
Tabla 10. Métricas aislado 8	35
Tabla 11. Métricas aislado 9	35
Tabla 12. Métricas aislado 10	36
Tabla 13. Mutaciones en HA en los 10 aislados que difieren con el genoma de referencia	37
Tabla 14. Mutaciones en HA en los 10 aislados que difieren con el genoma de la vacuna	38
Tabla 15. Mutaciones en NA en los 10 aislados que difieren con el genoma de referencia	39
Tabla 16. Mutaciones en NA en los 10 aislados que difieren con el genoma de la vacuna	39
Tabla 17. Mutaciones exclusivas para KC669389 y KC669386	40
Tabla 18. Descripción segmentos HA aislados de humanos comparados con HA de interés.....	41
Tabla 19. Numero de genomas empleados del Genbank con países de origen.....	52
Tabla 20. Descripción grupo externo	53
Tabla 21. Numero de secuencias tomadas del Genbank	53
Tabla 22. Aislados cercanos filogenéticamente a genomas de interés	59
Tabla 23. Sitios de N-glicosilación para aislados	62
Tabla 24. Tasa de mutaciones no sinónimas y sinónimas con genoma de referencia.....	64
Tabla 25. Tasa de mutaciones no sinónimas y sinónimas con genoma de la vacuna	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación partícula viral de Influenza A	17
Figura 2. Representación ciclo de replicación del virus de Influenza.....	18
Figura 3. Representación secuencias H7 casos de humanos y genomas de interés	41
Figura 4. Mutaciones en HA en comparación a JX397993.....	44
Figura 5. Mutaciones en HA en comparación con KC669389	45
Figura 6. Sitio de unión al receptor	46
Figura 7. Molécula de HA con loops resaltados	46
Figura 8. Mutaciones en NA en comparación a JX317626.....	47
Figura 9. Mutaciones en NA en comparación con KC669386	48
Figura 10. Loop 270 de NA.....	48
Figura 11. Loop 380 de NA.....	49
Figura 12. Loop 430 de NA.....	49
Figura 13. Filogenia entre los 10 genomas mediante Phypipe (RaxML).....	50
Figura 14. Filogenia entre los 10 genomas mediante Phypipe (Mr Bayes).....	51
Figura 15. Filogenia de 10 aislados con genomas del Genbank mediante Mr Bayes ..	54-55
Figura 16. Filogenia de 10 aislados con genomas del Genbank mediante RaxML.....	56-57
Figura 17. Topologías de grupos de interés por RaxML y Mr Bayes	58
Figura 18. Mapa de similitud de secuencias de H7N3.....	60
Figura 19. Mapa de similitud de secuencias de H7N3 con las secuencias más cercanas	61
Figura 20. Modelo de HA con sitios de N-glicosilación.....	63

RESUMEN

El virus de la influenza aviar del tipo A H7N3 es una problemática que afecta con mayor impacto a las aves de corral donde pueden adquirir un fenotipo de influenza de alta patogenicidad. La problemática se ve reflejada cuando estas aves de corral de muchas granjas se ven afectadas por este virus y mueren por la enfermedad o son sacrificadas por bioseguridad lo que se traduce a una pérdida económica y un riesgo en la seguridad alimentaria de muchas poblaciones, siendo los más vulnerables los pequeños productores que abastecen a mercados locales. Para el caso del brote en México, se reportaron 4.9 millones de aves sacrificadas, donde 358 granjas estaban en riesgo de contagio de sus aves (Aproximadamente 17 millones de aves de corral), esto implicó una pérdida de US\$750 millones que se destinaron para atender este caso en particular y los casos que se presentaron hasta el fin del año 2012. También hay importancia en el monitoreo a nivel genómico de las cepas H7N3 porque eventualmente pueden ocurrir mutaciones que favorezcan la infección a humanos

El análisis bioinformático tiene el objetivo de estudiar las posibles mutaciones que desarrolla el virus y comprender bajo qué tipo de selección evolutiva está sometido, este estudio ayuda a entender cómo este agente patógeno desarrolla habilidades para escapar o tener un mayor éxito frente al sistema inmune de su hospedero, además de identificar las posibles diferencias que puedan existir a nivel de genoma entre cada una de los 10 aislamientos comparado con el genoma de referencia y el empleado para el desarrollo de la vacuna empleada durante el brote, adicionalmente se realiza análisis filogenético con estos 10 aislamientos.

Para el desarrollo de este trabajo de grado se emplearon herramientas como GS Mapper, clustal W, Swiss-Model, Pymol, Phypipe, RaxML y Mr Bayes, estas herramientas permiten el cumplimiento de los objetivos propuestos para cada uno de los aislamientos proporcionados por el instituto de salud pública de México. Se obtuvo como resultado que existe una amplia diversificación de la cepa vacunal comparado con los genomas de este estudio, las mutaciones de hemaglutinina presentaron una selección positiva y hay indicios de que el brote del 2012 pudo provenir de los Estados Unidos.

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la influenza aviar tipo A es uno de los agentes patógenos que afectan más comúnmente a las aves de corral a nivel mundial. Este virus puede expresar dos fenotipos de enfermedad, el primero se denomina influenza aviar de baja patogenicidad (LPAI) que se encuentra principalmente en aves acuáticas y afecta el tracto digestivo y desencadena una enfermedad leve, muchas veces sin signos clínicos; el segundo tipo es la influenza aviar altamente patógena (HPAI) que generan un cuadro sintomático que incluye infección sistémica, signos clínicos severos y altas tasas de mortalidad (hasta un 100% dentro de las 72 horas) [1]. La organización mundial de sanidad ambiental (con sus siglas en inglés OIE) define que una cepa de virus de influenza es HPAI cuando tiene un índice de patogenicidad intravenosa de 1.2 en pollos de seis semanas de edad o un porcentaje de mortalidad de al menos 75% en pollos entre cuatro y ocho semanas de edad. También se asocia a aminoácidos presentes en el sitio de escisión de la hemaglutinina que sean similares a los que están presentes en aislamientos HPAI [2]. La cepa H7N3 HPAI tiene su último reporte de la variante LPAI de un aislado de patos domésticos en China en 2011 [3].

Durante el 2012 ocurrió un brote en el estado de Jalisco, México. Inicialmente se reportaron tres granjas comerciales donde los pollos infectados estaban en un rango entre las 32 y 94 semanas de edad, mostraron síntomas como depresión, alas caídas, postración, letargo, fiebre y muerte. Durante este primer reporte se sacrificaron 4.9 millones de pollos [1]. SENASICA realizó un muestreo de 358 granjas comparándolos con aislados de H7N3 de 34 granjas avícolas, dentro de las 358 granjas existe una población de 17 millones de aves en riesgo, donde un 60% corresponde a granjas productoras de huevos, 24.6% a granjas de pollos, 8.6% a aves de corral y el 6.9% restante a granjas reproductoras [1].

El presente trabajo de grado es una investigación que tiene por objetivo analizar los genomas suministrados por El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de México (SENASICA) de 10 aislamientos tomados al azar de pollos de galpón. Estos aislamientos corresponden al virus de la Influenza A H7N3, durante el brote de 2012 en el estado de Jalisco. Se analizaron los ocho segmentos de ribonucleoproteínas que componen el genoma de este virus empleando una metodología fundamentada en herramientas de la biología computacional, para dar cumplimiento exitoso a cada uno de los objetivos planteados.

2. JUSTIFICACIÓN

El virus de la influenza aviar del tipo A H7N3 está presente en las aves silvestres, pero con la característica de ser de baja patogenicidad. Al momento de que este virus entra en contacto con las aves de corral puede adquirir un aumento de virulencia que pueden generar cepas de alta patogenicidad. La problemática se ve reflejada cuando estas aves de corral de muchas granjas se ven afectadas por este virus y mueren por la enfermedad o son sacrificadas por bioseguridad, lo que se traduce a pérdidas económicas y al riesgo en la seguridad alimentaria de muchas poblaciones, siendo los más vulnerables los pequeños productores que abastecen a mercados locales. Para el caso del brote en México, se reportaron 4.9 millones de aves sacrificadas, donde 358 granjas estaban en riesgo de contagio de sus aves (Aproximadamente 17 millones de aves de corral) [1], esto implicó una pérdida de US\$750 millones que se destinaron para atender este caso en particular y los casos que se presentaron hasta el fin del año 2012 (The Poultry Site). En la tabla 1 [1], se reporta el costo estimado en tratamiento de algunos brotes de alta patogenicidad de influenza aviar (HPAI).

El análisis bioinformático permitirá estudiar las posibles mutaciones que desarrolla el virus y comprender las implicaciones que pueden tener las mismas en un contexto comparativo de los 10 genomas, la información obtenida ayudará a entender cómo este agente patógeno desarrolla habilidades para escapar o tener un mayor éxito frente al sistema inmune de su hospedero, además de identificar las posibles diferencias que puedan existir a nivel de genoma entre cada uno de estos aislados y engranarlo a un contexto filogenético, como a su vez, compararlos con la cepa de referencia con la cual se desarrolló la vacuna que empleó para controlar este brote.

El interés investigativo sobre este subtipo de influenza y de manera particular sobre las secuencias presentadas en este trabajo de grado, es lograr entender bajo un

perfil estructural, mutacional y filogenético, los 10 genomas problema para extraer conclusiones relevantes que permitan generar conocimiento para dirigir medidas preventivas y de control antes posibles brotes que se puedan presentar en un futuro. Aunque este brote se ha reportado masivamente en aves de corral, en México también se han confirmado 2 casos de infección en humanos con este virus de alta patogenicidad [4].

La vigilancia a nivel genómico de virus de influenza permite generar análisis novedosos sobre este agente patógeno, la bioinformática y la biología computacional permiten nutrir este tipo de análisis porque proveen información que ayuda a responder preguntas sobre origen, mecanismos de transmisión del virus, análisis evolutivos que dilucidan variabilidad del genoma por eventos de mutaciones y re-arreglos, como a su vez, grupos filogenéticamente cercanos que permiten extraer conclusiones de la historia epidemiológica evolutiva.

Tabla 1. Costo estimado de algunos brotes HPAI que han ocurrido en la industria aviar. [1]

Table 1. Estimated costs of some HPAI epidemics

Date and location of outbreaks	Cost
1983/84 Pennsylvania, USA H5N2 HPAI	17 million of birds destroyed US\$ 250 million
1997 China (Hong Kong, SAR) H5N1 HPAI	US\$ 100 million
1999/2000 Italy H7N1 HPAI	14 million of birds destroyed US\$ 620 million
2002 Chile H7N3 HPAI	500 000 birds destroyed US\$ 31 million
2003 Netherlands H7N7 HPAI	30 million of birds destroyed US\$ 750 million
2003 Karachi, Pakistan H7N3 HPAI	3.2 million of birds destroyed US\$ 8.6 million
2004 British Columbia, Canada H7N3 HPAI	17 million of birds US\$ 380 million

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL: Analizar comparativamente el genoma de 10 aislados de brote de virus de Influenza A H7N3.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Mapear las secuencias genómicas de H7N3 por medio de herramientas de biología computacional

3.2.2 Dilucidar la información relacionada con las mutaciones, tipos de selección y características a nivel evolutivo de H7N3

3.2.3 Generar modelos tridimensionales para la visualización de los segmentos de hemaglutinina y neuraminidasa, mapeando mutaciones puntuales y sitios de N-glicosilación.

3.2.4 Establecer las relaciones filogenéticas de los genomas de H7N3 reportados en el Genbank con los aislados de México de interés

4. ESTADO DEL ARTE

4.1. Antecedente del proyecto: Se analizaron 7 aislados del virus de la influenza A H7N3 en lo que concierne a estructura y filogenia con énfasis en el segmento 4 que corresponde a la hemaglutinina y se identificó un amplio *drift* antigénico para el segmento en cuestión. Estos aislados se compararon con el genoma de referencia A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3).

Particularmente se identificaron 3 mutaciones no sinónimas que están involucradas en la generación de 3 nuevos sitios putativos de N-glicosilación en el dominio globular en comparación a la cepa de referencia A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3), esto resulta interesante, ya que indica un mecanismo de adaptación del virus para escapar de la neutralización mediada por anticuerpos.

4.2. Composición del virus de la Influenza aviar.

La influenza Aviar (AI) es una enfermedad de tipo viral que puede ocurrir en diferentes especies de aves de corral y que posee la característica de ser altamente patogénica (HP) lo que le otorga a esta enfermedad una alta y rápida mortalidad de la población infectada [5]. En aves se han detectado 16 subtipos de hemaglutinina (HA) y 9 tipos de neuraminidasa (NA) [6]. Las aves son reservorios naturales para la influenza de baja patogenicidad, la cual no representa riesgo de muerte. Al momento de introducir los subtipos H5 o H7 puede resultar en la generación de virus con alta patogenicidad gracias a cambios genéticos en el gen que codifica para HA, estos cambios se dan cuando la molécula de hemaglutinina no ha sufrido la escisión post-traducciona (HA0) por las proteasas del hospedero, cuando la molécula de HA sufre la escisión, ésta cambia conformacionalmente lo que le permite que la envoltura del virus se fusione con la membrana de los endosomas permitiendo la

liberación de las nucleocapsides dentro del citoplasma de la célula hospedero, se ha mostrado que en muchos casos repeticiones directas de secuencias ricas en purinas (AAGAAA) en las hemaglutinina de H5 y H7 tiene relación con un incremento en la patogenicidad [7].

Los brotes de influenza aviar de alta patogenicidad han sido reportados en el continente americano, en mayo del 2002 ocurrió un brote en granjas chilenas el cual fue confirmado y posteriormente controlado por un estricto régimen de bioseguridad [8]. Otro evento ocurrió en aves de corral en Columbia Británica en 2004 y en Saskatchewan para el 2007, interesantemente se reportó que fue causado por virus de baja patogenicidad de influenza aviar de aves acuáticas [9].

Para el caso particular del contexto mexicano, en junio del 2012 se reportó la presencia de H7N3 HPAI en una capa de un huevo de pollo en el estado de Jalisco una región altamente productora de las aves de corral que abastece cerca del 55% de producción de huevo a toda la república mexicana [10]. La cepa mexicana fue determinada como cercanamente relacionada a cepas de aves silvestres de Norteamérica, se desconoce con certeza el origen de esta cepa mexicana, pero se sospecha que Virus de influenza aviar de baja patogenicidad de aves silvestres cuando infectaron a los pollos estos mutaron a una forma de alta patogenicidad. Este brote dejó como consecuencia 22 millones de aves muertas que se traducen a un costo mayor de los 720 millones de dólares [11].

Los virus de la influenza, pertenecen a la Familia *Orthomyxoviridae*, es un virus de RNA negativo, y su genoma está dividido en 8 segmentos. Todos los segmentos de RNA están empacados en una proteína de nucleocápside, y un complejo de proteínas de polimerasa están unidos a cada segmento del genoma. Estos complejos proteicos se encuentran empaquetados en una envoltura de lipoproteína, cubriendo desde el interior con la proteína de matriz, en la superficie de la partícula viral se exponen las proteínas hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y M2 [11]. Estas proteínas de superficie se insertan radialmente a modo de proyecciones o espículas, las dos glicoproteínas del virus, HA (forma de trímeros) y la NA (en forma

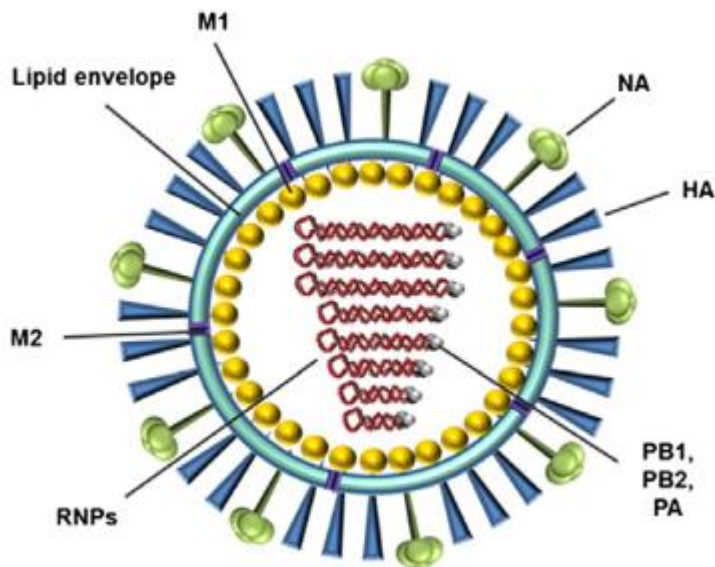
de tetrámeros), también se inserta la proteína M2 (en forma de tetrámeros) pero en un pequeño número (Figura 1). La influenza tipo C tiene solamente una glicoproteína de superficie (HEF).

El virus de la Influenza posee proteínas estructurales y no estructurales, dentro de este último grupo se encuentran los tres segmentos más largos son los que pertenecen al grupo de polimerasas (PB2, PB1 y PA) que hacen alusión a sus propiedades isoelectrónicas, siendo los básicos PB2 y PB1 y ácida PA. Estos genes son los encargados de transcribir los mRNAs para la síntesis de la cadena de RNA molde de sentido positivo (cRNA), posteriormente transcriben los cRNAs en los segmentos génicos que se van a incorporar en los virus de progenie (vRNAs). El segmento 8 codifica dos proteínas debido al splicing alternativo, se denominan NS1 y NS2, pero se ha demostrado que NS2 es un componente de viriones y por tener funciones de exportar nuevas ribonucleoproteínas sintetizadas desde el núcleo se le ha denominado también como proteína nuclear exportadora (NEP); NS1 tiene varias funciones, es un regulador de splicing del mRNA y traducción y tiene un papel relevante en la modulación de la respuesta del interferón en la infección viral [12].

Dentro de las proteínas estructurales se alojan el segmento 4 el cual codifica la hemaglutinina que se encarga de la unión de los virus al receptor de superficie de membrana que es al ácido siálico, y adicional a esto dirige la fusión de membrana durante la entrada del virus a la célula hospedera. Por tratarse de una proteína expuesta de la partícula viral es el principal objetivo de la neutralización por parte de los anticuerpos. El quinto segmento codifica la nucleoproteína (NP) la cual encapsula los cRNAs y los vRNAs, los cuales son necesarios para ser reconocidos como el molde para la polimerasa viral. La neuraminidasa es producida por el segmento 6, esta se encarga de escindir el ácido siálico del virus y la célula hospedera para la liberación de viriones maduros. Finalmente, el segmento 7 tiene como resultado dos productos génicos que son la proteína de matriz (M1) y la proteína M2, la primera es un RNA mensajero que su producto es conferir un rol

estructural en el virión que se cree que es conferir una intervención en el ensamblaje del virión, la segunda es una pequeña proteína transmembranal derivada de un empalme de mRNA, esta proteína tiene una actividad de canal de protones que ayuda al desmontaje del virus durante los estados iniciales de la infección [12]

Figura 1. Representación de partícula viral del virus de influenza A. Hemaglutinina (azul), Neuraminidasa (verde), proteínas de canal de protones (morado), proteína de cápside M1 (amarillo). Los 8 segmentos genéticos en ribonucleoproteínas (rojo) que se compone del RNA viral, nucleoproteína (NP) y las proteínas de polimerasas virales en color gris (PB1, PB2, PA) [13]

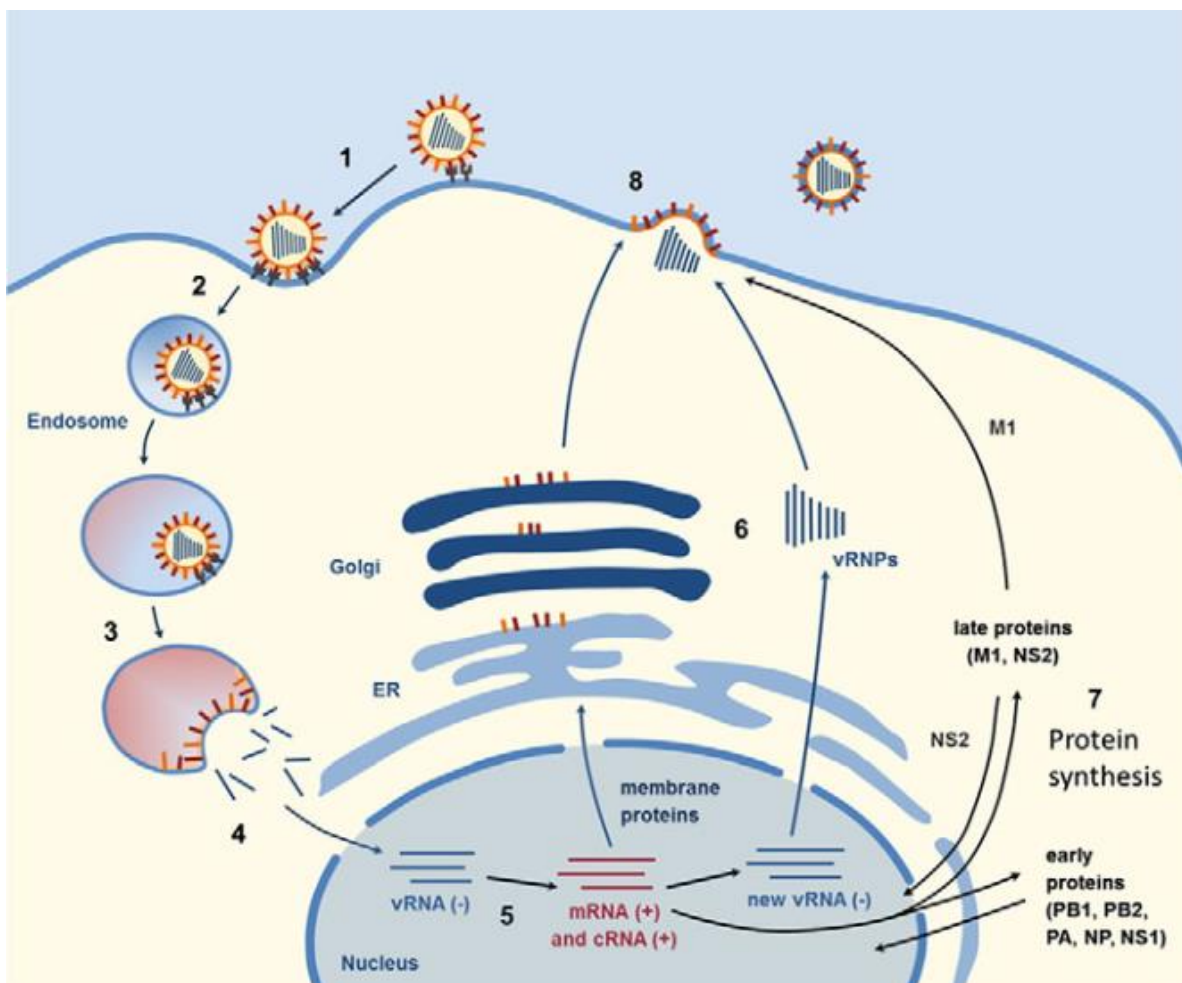


4.3 Ciclo de replicación

1) Los virus de influenza se adhieren a los residuos de ácido siálico de la célula hospedera mediante HA, posteriormente ingresan a la célula por endocitosis 2) se forma un endosoma que se transporta por microtúbulos, 3) una disminución en el pH del endosoma hace un cambio conformacional en la molécula de HA y la envoltura viral se fusiona con la membrana del endosoma, esto ocasiona que se liberen las ribonucleoproteínas al citoplasma que se transportan al núcleo, 4) El RNA viral se transcribe en mRNA y en un nuevo RNA viral, 5) luego de la generación del

nuevo RNA mensajero viral, las proteínas de membrana (HA, NA, M2) se producen en el retículo endoplasmático, 6) las proteínas virales tempranas (PB1, PB2, PA, NP, NS1) y tardías (M1, NS2) son traducidas y transportadas de nuevo al núcleo donde se forman nuevas ribonucleoproteínas virales con la nucleoproteína (NP) y el complejo de polimerasas (PB1, PB2, PA). 7) Estas nuevas ribonucleoproteínas virales y M1 son transportadas a la membrana plasmática, donde 8) se ensamblan nuevas partículas virales que luego serán liberadas. (Figura 2)

Figura 2. Representación del ciclo de replicación del virus de la influenza [13]



4.4. Mutaciones del virus

Se han reportado mutaciones que permiten que el virus de influenza pueda escapar

a neutralización por anticuerpos, ser resistente a medicamentos, mutaciones en el sitio de unión del receptor que afectan la afinidad a la célula hospedera, entre otras [12].

Los virus que son mutantes a una neutralización por parte de los anticuerpos, poseen sus cambios a nivel de las glicoproteínas de superficie, particularmente a HA. Se han reportado varias mutaciones en los sitios de unión para los anticuerpos gracias a los análisis de los mutantes resistentes [13]. Las regiones antigénicas identificadas en la neutralización anti-HA se distribuyen a nivel estructural en los sitios que evolucionan durante el drift antigénico, estos sitios están próximos a el bolsillo relativamente conservado de unión de receptor de HA [14].

Para el caso de resistencia a medicamentos, se han diseñado varios compuestos que se dirigen a NA debido a que se unen a su sitio activo de manera más fuerte comparado con el ácido siálico, es por ello que tiene una actividad antiviral estos fármacos [15]. Los mutantes NA tienen cambios en su sitio activo específicamente en aquellos residuos involucrados en catálisis o en los que se asocian a estabilidad estructural [16].

Mutaciones a nivel de unión de receptor se vinculan a especificidad de unión de la hemaglutinina del virus, debido a que existen dos tipos de unión entre ácido siálico, $\alpha(2,3)$ y $\alpha(2,6)$ y la galactosa en las cadenas laterales de carbohidratos. La mayoría de hemaglutininas de los virus de influenza que afectan a aves y equinos tienen mayor preferencia por reconocimiento de receptores que contienen el enlace $\alpha(2,3)$ y los virus de influenza que afectan a humanos tienen preferencia por el enlace $\alpha(2,6)$. Ambos tipos de receptores están presentes en las células de los cerdos, es por ello que una coinfección con virus de aves y de humanos puede generar un rearreglo entre los segmentos y genera un nuevo subtipo del virus con potencial zoonótico [17]. La importancia de las mutaciones asociadas a este receptor es que algunas mutaciones pueden variar la preferencia o especificidad por el tipo de enlace y pasar de infectar aves y equinos a humanos [13]. Mutaciones como la Q226L en el loop 210 (numeración en H3) se ha reportado en hemaglutinina de los subtipos H5 y H7 se ha visto involucrado en favorecer la afinidad del virus a

humanos y ser transmitido vía aérea [61, 62]

4.5 Recombinación RNA

Para este virus se han reportado muy pocos casos de recombinación de RNA, caso contrario al evento de reorganización de segmentos génicos. Se han reportado experimentos donde ocurre recombinación de RNA [18, 19, 20, 21] pero de manera natural ha sido un poco extraño encontrar este tipo de eventos, un caso que documenta una recombinación es el presentado por Gibbs *et al.* donde dan evidencia de recombinación de hemaglutinina en la gripe española en 1918 [22]. Se especuló que la región del tallo de HA provenía de un linaje de influenza que afectaba humanos, mientras el dominio globular de esta molécula proviene de virus que afectan a cerdos.

4.6 Antigenicidad

Las propiedades genéticas y diversidad ecológica hacen que el virus de Influenza A sea un ejemplo de un virus re-emergente [12].

4.6.1. Shift antigénico

Mutaciones que ocurren cuando una célula es infectada simultáneamente por dos virus de diferente subtipo de influenza, cuyos segmentos genómicos se re-asocian durante el ensamble de una sola partícula viral [23,24]. Estos re-arreglos pueden conferir ventajas al virus para infectar otras especies [25]. Un ejemplo es la pandemia de 1957 y 1968, donde los virus eran derivados de un reordenamiento de cepas de aves y humanos [26, 27]. En 1957, los segmentos HA, NA y PB1 venían de virus de aves y los otros segmentos provenían del virus H1N1 que afectan al humano, estos virus estaban circulando en el mismo periodo de tiempo [26].

Los virus que afectan a las aves generalmente no se replican bien en humanos y tampoco se da en el sentido contrario, es por ello que se necesita de un intermediario para que se dé un reordenamiento de segmentos. Los cerdos tienen la particularidad de ser un “recipiente de mezcla” para estos re-arreglos [27] debido a que los virus que afectan a las aves y al humano se pueden replicar en este

hospedero [28, 29] debido a que en las células de la tráquea del cerdo, donde ocurre la replicación del virus, contiene los receptores para el virus aviar ($\alpha(2, 3)$) y los receptores para las cepas que afectan al humano ($\alpha(2, 6)$) [30]

4.6.2. Drift genético

Mutaciones en las glicoproteínas de membrana del virus es lo que da sustento al drift antigénico. Esto desencadena que las acumulaciones presentadas en las moléculas de HA y NA evitan una acción neutralizante por parte de los anticuerpos no sea exitosa. La rápida y continua evolución de los diferentes subtipos puede ser a causa de la presión de selección que ejerce los anticuerpos o los medicamentos. Las glicoproteínas muestran altas tasas de evolución, para HA es de aproximadamente 6.7×10^{-3} sustituciones por nucleótido por año, y para NA es de 3.2×10^{-3} sustituciones por nucleótido por año [31]. En hemaglutinina, la mayoría de estas mutaciones ocurren en el dominio globular (HA1) como resultado de selección inmune. Estas variaciones genéticas deben de ser constantemente vigiladas para determinar cuáles son las cepas circulantes y un posterior desarrollo de vacunas, es por ello que éstas últimas deben estar en constante actualización [12].

4.7 El virus de la influenza en aves domésticas

Los tipos que se han visto involucrados en infecciones de aves domésticas se pueden dividir en dos grupos.

1. virus de baja patogenicidad: subtipos de virus de influenza que se limitan a las células de los tractos digestivo y respiratorio, su manifestación clínica es leve y es casi que imperceptible un cuadro sintomático [24, 32]
2. virus de alta patogenicidad: se presentan síntomas asociados a signos respiratorios, retraso en el crecimiento o disminución de la postura, generan alta mortalidad. Este grupo se asocia a los subtipos H5 y H7 que pueden alcanzar tasas de mortalidad hasta del 100% [24, 32]

La primera vez que se reportó la presencia del virus en aves domésticas fue en 1878 [33] en Italia, en donde se produjo un brote con una elevada mortalidad. A partir del año 1959 se han venido reportando a nivel mundial los diferentes brotes de alta patogenicidad (subtipos H5 y H7) que se han venido presentando. La patogenicidad para estos subtipos de virus es medida por la capacidad de causar la muerte a ocho aves susceptibles infectadas por vía intravenosa, en un periodo máximo de 10 días después de la inoculación. Aquellos que causan una mortalidad igual o mayor al 75% se consideran de alta patogenicidad [32]. En la tabla 2 se muestra el cuadro generada por García y Ramos (2006) [34] de los eventos de brotes por virus de alta patogenicidad.

Tabla 2. Brotes de influenza de los subtipos H5 y H7 [34]

Cuadro II
AISLAMIENTOS DE VIRUS DE INFLUENZA DE ALTA
PATOGENICIDAD NOTIFICADOS DESDE 1959

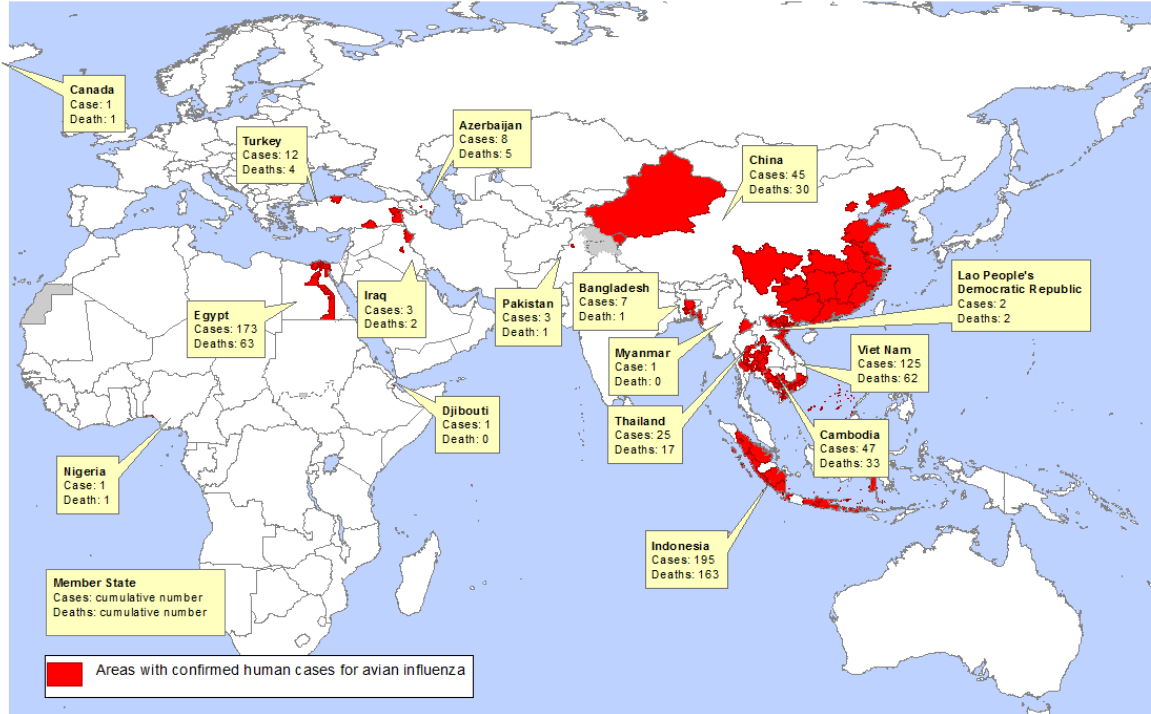
<i>Especie aviaria</i>	<i>País, estado o región</i>	<i>Año</i>	<i>Subtipo</i>
Pollos	Escocia	1959	(H5N1)
Pavos	Inglaterra	1963	(H7N3)
Pavos	Ontario, Canadá	1966	(H5N9)
Pollos	Victoria, Australia	1976	(H7N7)
Pollos	Alemania	1979	(H7N7)
Pavos	Inglaterra	1979	(H7N7)
Pollos y pavos	Pennsylvania, EUA	1983	(H5N2)
Pavos	Irlanda	1983	(H5N8)
Pollos	Victoria, Australia	1985	(H7N7)
Pavos	Inglaterra	1992	(H5N1)
Pollos	Victoria, Australia	1992	(H7N3)
Pollos	Queensland, Australia	1994	(H7N3)
Pollos	México	1994	(H5N2)
Pollos	Paquistán	1994	(H7N3)
Pollos	Nueva Gales, Australia	1997	(H7N4)
Pollos	Hong Kong	1997	(H5N1)
Pollos y pavos	Italia	1997	(H5N2)
Pollos y pavos	Italia	1999	(H7N1)
Pollos y pavos	Chile	2002	(H7N3)
Pollos y pavos	Holanda-Bélgica-Alemania	2003	(H7N7)
Diferentes especies domésticas y silvestres	Diferentes países en Asia	2003	
Pollos	Canadá	2004	(H5N1)
Pollos	Texas	2004	(H7N3)
Avestruces	Sudáfrica	2004	(H7N3)
Diferentes especies domésticas y silvestres	Diferentes países de Asia, Medio Oriente, Europa y África	2005	
		2006	(H5N1)

La influenza aviar ha tenido impactos en la salud humana, un ejemplo es el caso reportado en Asia en el año 1997 por el subtipo H5N1 [52-55], este virus tuvo una mortalidad del 33% del cual de 18 personas infectadas murieron 6 [52,53]. Luego de realizar los análisis retrospectivos se encontró que en los meses de marzo y abril de 1997 se habían reportado casos de influenza aviar de alta patogenicidad en granjas de Hong Kong, se desató una conclusión congruente con el primer caso reportado en mayo de ese mismo año, el cual fue un niño de tres años que presentaba problemas respiratorios agudos y murió en un hospital de Hong Kong, este primer paciente y todos los demás reportados habían tenido contacto con las aves enfermas. El estudio molecular mostró que el virus se originó debido a la reasociación de tres virus que se encontraban circulando en aves silvestres y domésticas [56].

En diciembre de 2003-2004, ocurrió un brote de H5N1 que inició en la República de Corea, que se dispersó rápidamente por Vietnam en donde se identificó como la causa de la muerte de tres personas [57], luego pasó a Japón, Tailandia, Camboya, Hong Kong, República Democrática Popular de Laos y China [57,58,59]. Durante este brote se reportaron 35 casos de infecciones a humanos con H5N1 donde 23 pacientes murieron.

En la siguiente figura proporcionada por la organización mundial de la salud se observa la incidencia de infecciones humanas por la influenza aviar H5N1 durante el periodo 2003-2013

Areas with confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2013*



*All dates refer to onset of illness
Data as of 24 January 2014
Source: WHO/GIP

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or its authorities, or concerning the delimitation of its borders or boundaries. It is intended that these designations should be used in the same manner as they are used in the WHO publications. © WHO 2013. All rights reserved.



Actualmente se han reportado infecciones humanas por el virus de la gripe aviar H7N9, para el 20 de abril de 2017 se han confirmado 15 casos con este subtipo en China continental (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017)

Los reportes de infecciones a humanos con H7N3 comenzaron el 27 de marzo de 2017. EL número de casos es de 1 en Anhui, 1 en Beijing, 1 en Gansu, 2 en Henan, 1 en Hunan, 2 en Shandong, 3 en Sichuan, 1 en Tianjin, 2 en Tíbet y 1 en Zhejiang. Del total de 15 casos hay dos fallecidos, un caso leve siete se han diagnosticado con neumonía grave, adicional a esto, 12 personas tienen antecedentes de haber estado expuestas a aves de corral vivas. (OMS, 2017)

5. METODOLOGIA

5.1. Generación secuencias consenso

Se procesaron 10 archivos en formato *.sff que corresponden a los 10 aislamientos de pollos tomados en el estado de Jalisco, México, tales archivos provenían de la secuenciación Roche 454. Para cada archivo se realizaron dos mapeos independientes con el genoma de referencia *A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)*, el primero con la herramienta GS Mapper (Roche, versión 2.9) y el segundo con la herramienta CLC (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>), se ensamblaron los reads sobre el genoma de referencia, se generó una secuencia consenso para cada segmento de los aislamientos con estos dos mapeos, curando las secuencias manualmente comparando consenso de genoma de referencia, mapeo de GS Mapper y mapeo de CLC, donde se identificaron los diferentes contigs y el porcentaje de cobertura de los segmentos de cada aislado. La curación se realizó para los segmentos de hemaglutinina, Neuraminidasa, Proteína de Matriz, Proteína no estructural y Nucleoproteína, únicamente para estos 5 segmentos porque los que corresponden al conjunto de polimerasas (PB2, PB1 y PA) presentaron baja cobertura y bajos niveles de calidad. Finalmente, se generaron como resultado a esta curación manual, archivos fasta que contenían cada secuencia consenso para cada segmento.

Los alineamientos múltiples se realizaron mediante la evaluación de los diferentes contig de cada uno de los 8 segmentos de los 10 aislados para identificar el marco de lectura o si existen desplazamientos en el mismo. Se empleó Clustal W [35] para realizar el alineamiento y la traducción.

Para comprender la similitud de cada secuencia de los segmentos, se sometieron los archivos fasta a un BLASTn [64] y se reportó para cada segmento el genoma con el cual reportaba mayor porcentaje de identidad.

5.2. Mapeo de mutaciones

Para visualizar las secuencias de los segmentos se empleó el Jalview [65], se buscaron mutaciones en los segmentos de hemaglutinina y Neuraminidasa de cada uno de los 10 aislamientos. Para buscar las mutaciones se compararon los segmentos con respecto al genoma de referencia con el cual se realizó el ensamblaje y con el genoma de referencia *A/cinnamon teal/Mexico/2817/2006(H7N3)* que se empleó para desarrollar la vacuna que se suministró a los pollos durante este brote.

5.3 Análisis de selección

Se realizó un alineamiento de los segmentos de hemaglutinina de los 10 aislados, el primero en comparación al genoma *A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)* (código de acceso JX397993) y el segundo con el genoma *A/cinnamon teal/Mexico/2817/2006(H7N3)* (código de acceso KC669389), se suministraron los alineamientos en la plataforma SNAPv2.1.1 (www.hiv.lanl.gov) [49] para generar la tasa de mutaciones no sinónimas y sinónimas para cada secuencia de HA de cada aislado.

5.4. Modelos estructurales

Se tomó el aislado que más mutaciones presentaban en las moléculas de HA y NA para generar el modelo por homología con su secuencia.

El modelado estructural se ejecutó en la plataforma de Swiss-Model [36] y se empleó Pymol [37] para edición y visualización, representando cada una de las mutaciones en la molécula obtenida en Swiss-Model.

5.5 Análisis de N-glicosilación

Se ingresaron archivos fasta de aminoácidos para la proteína Hemaglutinina de cada uno de los 10 aislados, a la plataforma NetNGlyc 1.0 Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> [48]

5.6 Reconstrucción filogenética

5.6.1 Phypipe

Para la generación de árboles únicamente con cuatro segmentos (Hemaglutinina, Nucleoproteína, Neuraminidasa y proteína de Matriz) de los genomas de los aislados, se utilizó la herramienta Phypipe [40]. Los aislados se nombraron de la siguiente manera:

Aislado 1: 16_01

Aislado 6: 16_06

Aislado 2: 16_02

Aislado 7: 16_07

Aislado 3: 16_03

Aislado 8: 16_08

Aislado 4: 16_04

Aislado 9: 16_09

Aislado 5: 16_05

Aislado 10: 16_10

Se generaron dos topologías, la primera por el método de máxima verosimilitud (RaxML) con 1000 repeticiones de bootstrap, y la segunda por el método de inferencia bayesiana (MrBayes) con 10 millones de generaciones (ngen)

5.6.2 Filogenias con genomas de Genbank y genomas de interés

La búsqueda de las secuencias de virus de influenza para realizar los árboles filogenéticos se realizó en el portal *NCBI influenza virus resources* con los siguientes parámetros de búsqueda:

Type: A, Host: Avian, Country/Region: any, Protein: any, Subtype H7N3

Se tomaron 126 genomas (tabla 19) de esta base de datos sin contar los dos grupos externos (tabla 20) ni los 10 genomas aquí presentados, el rango de años de reporte para estos genomas es de 1943-2016. Finalmente se tomaron 138 genomas para la reconstrucción filogenética.

Se concatenaron los 4 segmentos de interés (Hemaglutinina, Nucleoproteína, Neuraminidasa y proteína de Matriz), se realizó la búsqueda del modelo de evolución de nucleótidos en PartitionFinder (<http://www.robertlanfear.com/partitionfinder/>). La primera topología se elaboró por el método de Máxima Verosimilitud: Randomized Axelerated Maximum Likelihood [38] (RaxML) bajo el modelo de evolución GTR+G y con 5000 repeticiones de bootstrap. La segunda topología se realizó con el método de inferencia Bayesiana (MrBayes) [39] con el modelo de evolución GTR+I+G a excepción del segmento de la proteína de matriz que se realizó con el modelo de evolución SYM+I+G. Los arboles se ejecutaron en el portal CIPRES (<https://www.phylo.org/>)

Para ambas topologías los genomas de interés se nombraron de la siguiente manera:

Aislado 1: chicken_mexico_jalisco_INSP_01_2012

Aislado 2: chicken_mexico_jalisco_INSP_02_2012

Aislado 3: chicken_mexico_jalisco_INSP_03_2012

Aislado 4: chicken_mexico_jalisco_INSP_04_2012

Aislado 5: chicken_mexico_jalisco_INSP_05_2012

Aislado 6: chicken_mexico_jalisco_INSP_06_2012

Aislado 7: chicken_mexico_jalisco_INSP_07_2012

Aislado 8: chicken_mexico_jalisco_INSP_08_2012

Aislado 9: chicken_mexico_jalisco_INSP_09_2012

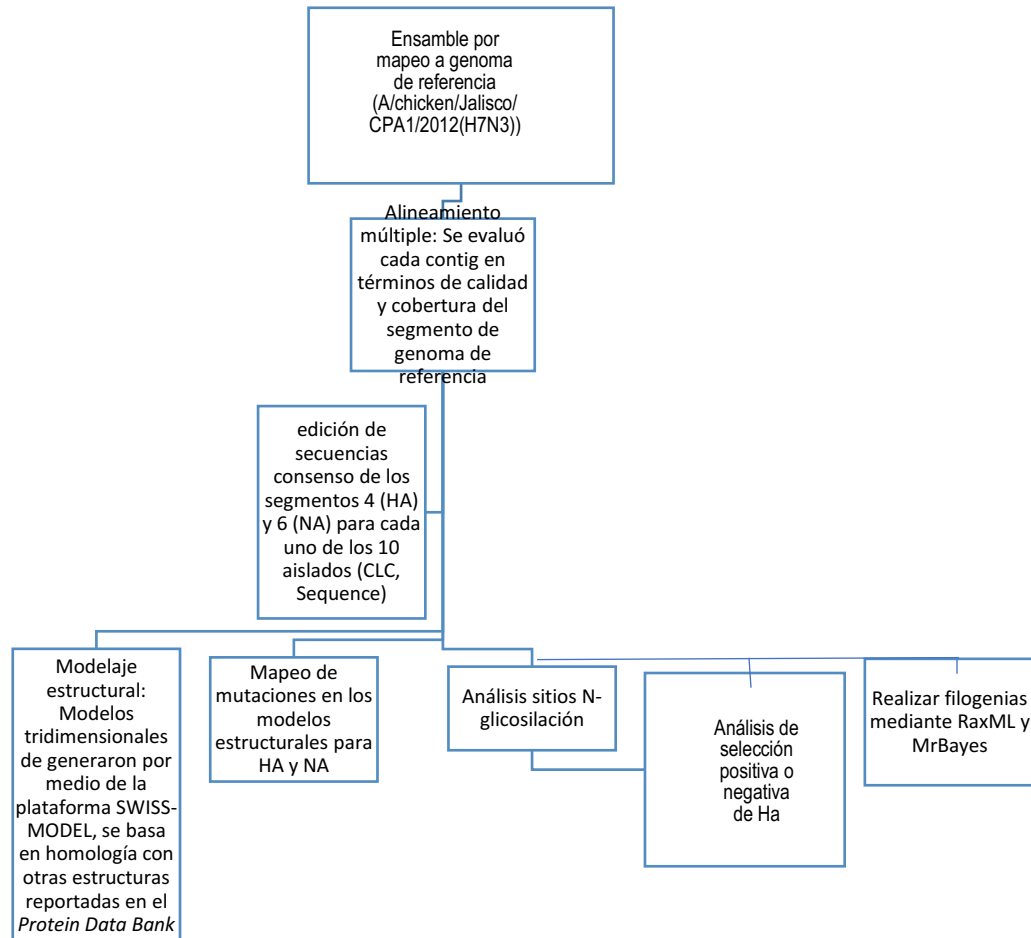
Aislado 10: chicken_mexico_jalisco_INSP_10_2012

5.7 Mapa de similitud de secuencia

Se comparó las secuencias del segmento HA de los 6 especímenes más cercanos filogenéticamente al grupo de interés (ver tabla 22) de los 10 aislados mediante el mapeo de similitud de secuencias (SSM) en la plataforma OpenfluDB [47].

6. RESULTADOS

Flujo del trabajo para obtener los resultados del proyecto fueron los siguientes:



6.1. Métricas para cada uno de los 10 aislados

Aislado 1

Tabla 3. Métricas aislado 1

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A01_contig00001	1256	5%	100%	6 (NA)	KX351941.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-02457-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX397993		A01_contig00002	2754	11%	100%	4 (HA)	KX351924.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-02457-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465631		A01_contig00003	7423	30%	100%	7 (MP)	KX351927.1	99	Human	A/chicken/Puebla/CPA-02457-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465632		A01_contig00004	8121	33%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465633		A01_contig00005	4311	18%	100%	5 (NP)	KX351965.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-02457-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465634		A01_contig00006; A01_contig00007	38	0%	89%	2 (PB1)	KX351939.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-02457-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465635		A01_contig00008; A01_contig00009	76	0%	91%	1 (PB2)	KX351944.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-01858-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465636		A01_contig00010	36	0%	85%	3 (PA)	KX351964.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-02457-16-CENASA-95294/2016(H7N3)

La comparación de secuencias de los 8 segmentos del aislado 1 mediante la herramienta BLASTn [41], se identificó que los segmentos 6,4,7,5,2 y 3 presentaron mayor identidad con la cepa A/chicken/Puebla/CPA-02457-16-CENASA-95294/2016(H7N3), el segmento 1 tiene esta identidad con la cepa A/chicken/Jalisco/CPA-01858-16-CENASA-95294/2016(H7N3) y el segmento 8 tiene su mayor identidad con la cepa A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3) (Tabla 3). Todos los segmentos presentaron el mismo porcentaje de identidad al momento de ser comparados (99%). El segmento que menor porcentaje de cobertura tiene es el 3 (PA) y los segmentos 6, 4, 7, 8 y 5 tiene coberturas del 100%.

Aislado 2

Tabla 4. Métricas aislado 2

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A02_contig00001	5744	3.40%	100%	6 (NA)	CY125730.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX397993		A02_contig00002	21949	12.80%	100%	4 (HA)	CY125728.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465631		A02_contig00003	46196	27%	100%	7 (MP)	CY125731.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465632		A02_contig00004	86681	50.70%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465633		A02_contig00005	1992	1.20%	100%	5 (NP)	JX465633.1	98	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)
JX465634		A02_contig00006	2553	1.50%	100%	2 (PB1)	CY125726.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465635		A02_contig00007; A05_contig00008	2041	1.20%	100%	1 (PB2)	KX289640.1	98	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-03191-16-CENASA-95076/2016(H7N3)
JX465636		A02_contig00009	331	0.20%	100%	3 (PA)	CY125727.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)

De los 8 segmentos comparados, 6 presentaron una mayor identidad con la cepa A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3) (6,4,7,8,2 y 3), el segmento 5 presentó un mejor

match con A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3) mientras que el segmento 1 lo hizo con A/chicken/Puebla/CPA-03191-16-CENASA-95076/2016(H7N3). El segmento que menos % de identidad presento fue HA con un 97%. Todos los segmentos presentaron un porcentaje de cobertura del 100% (tabla 4).

Aislado 3

Tabla 5. Métricas aislado 3

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description	
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A03_contig00001	4205	5.10%	100%	6 (NA)	CY125730.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX397993		A03_contig00002	10513	12.80%	100%	4 (HA)	CY125728.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465631		A03_contig00003	19973	24.30%	100%	7 (MP)	CY125731.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465632		A03_contig00004	40718	49.60%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465633		A03_contig00005	5442	6.60%	100%	5 (NP)	JX465633.1	98	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	
JX465634		A03_contig00006;									
JX465634		A03_contig00007	45	0.10%	100%	2 (PB1)	CY125726.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465635		A03_contig00008	64	0.10%	100%	1 (PB2)	CY125725.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465636		A03_contig00009;									
JX465636		A03_contig00010	233	30.00%	100%	3 (PA)	CY125727.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	

Para este aislado, todos los segmentos reportaron un mejor match con la cepa A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3), a excepción del segmento 5 que lo tiene con A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3). El porcentaje de identidad de la hemaglutinina fue el que tuvo menor porcentaje de identidad (97%). Todos los segmentos presentaron un porcentaje de cobertura del 100% (tabla 5)

Aislado 4

Tabla 6. Métricas aislado 4

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description	
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A04_contig00001	4064	3.70%	100%	6 (NA)	CY125730.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX397993		A04_contig00002	9294	8.40%	100%	4 (HA)	CY125728.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465631		A04_contig00003	26692	24.10%	100%	7 (MP)	CY125731.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465632		A04_contig00004	60526	54.60%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465633		A04_contig00005	7420	6.70%	100%	5 (NP)	JX465633.1	98	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	
JX465634		A04_contig00006	68	0.10%	100%	2 (PB1)	CY125726.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465635		A04_contig00007;									
JX465635		A04_contig00008	127	0.10%	85.18%	1 (PB2)	CY125725.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465636		A04_contig00009	505	0.50%	100%	3 (PA)	CY125727.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	

De los 8 segmentos al momento de ser sometidos a Blastn, 7 de ellos (6,4,7,8,2,1,3) mostraron alto porcentaje de identidad con la cepa A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3), únicamente el segmento 5 se vinculó con la cepa A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3). Lo que respecta a porcentajes de identidad, todos presentaron un porcentaje mayor o igual a 98%. El segmento 1 (PB2) fue el que presento menor porcentaje de cobertura (85.18%), el resto de

segmentos presentan coberturas del 100% (Tabla 6)

Aislado 5

Tabla 7. Métricas de aislamiento 5

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description	
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A05_contig00001	4552	5.50%	100%	6 (NA)	KX351910.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	
JX397993		A05_contig00002	12223	14.80%	100%	4 (HA)	KR821169.1	100	Avian	A/chicken/Guanajuato/07437-15/2015(H7N3)	
JX465631		A05_contig00003	23863	28.90%	100%	7 (MP)	KX351927.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	
JX465632		A05_contig00004	32375	39.30%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	
JX465633		A05_contig00005	8828	10.70%	100%	5 (NP)	KX351901.1	99	Avian	A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	
JX465634		A05_contig00006;									
		A05contig00007	102	0.10%	94%	2 (PB1)	KX351898.1	99	Avian	A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	
JX465635		A05_contig00008;									
		A05_contig00009	160	0.20%	100%	1 (PB2)	KX351905.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	
JX465636		A05_contig00010	94	0.10%	100%	3 (PA)	KX351907.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	

En los segmentos de este genoma, se observó que tiene asociación con 5 cepas diferentes. Los segmentos que corresponden a NA, PB2 y PA presentan mayor porcentaje de identidad con la cepa A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3), los segmentos NP y PB1 tiene un mejor match con A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016(H7N3), el segmento HA lo tiene con A/chicken/Guanajuato/07437-15/2015(H7N3), el segmento MP con A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3) y finalmente el segmento NS tiene un mejor match con A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3). El que mejor porcentaje de identidad obtuvo fue el segmento HA (100%) y el resto de segmentos lograron un porcentaje de 99% de identidad. El segmento 2 (PB1) tiene el menor porcentaje de cobertura (94%) comparado con los otros segmentos de este aislamiento que tiene el 100% (tabla 7)

Aislado 6

Tabla 8. Métricas aislado 6

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A06_contig00001	8455	6.90%	100%	6 (NA)	CY125730.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX397993		A06_contig00002	3149	2.60%	100%	4 (HA)	CY125728.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465631		A06_contig00003	66956	54.60%	100%	7 (MP)	CY125731.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465632		A06_contig00004	35278	28.80%	100%	8 (NS)	CY125732.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465633		A06_contig00005	2545	2.10%	100%	5 (NP)	JX465633.1	98	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)
JX465634		A06_contig00006	1426	1.20%	100%	2 (PB1)	CY125726.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465635		A06_contig00007	2709	2.20%	100%	1 (PB2)	KX289640.1	98	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-03191-16-CENASA-95076/2016(H7N3)
JX465636		A06_contig00008	795	0.60%	100%	3 (PA)	CY125727.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)

Los segmentos 6,4,7,8,2 y 3 presentaron mayor porcentaje de identidad con la cepa A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3), mientras que el segmento 5 mostró una mejor identidad con la cepa A/chicken/Puebla/CPA-03191-16-CENASA-95076/2016(H7N3). Todos los segmentos mostraron un porcentaje de identidad del 98% a excepción de los segmentos 6 y 7 que obtuvieron un 97% de identidad. Todos los segmentos presentaron coberturas del 100% (tabla 8)

Aislado 7.

Tabla 9. Métricas aislado 7

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A07_contig00001	5638	6.80%	100%	6 (NA)	CY125730.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX397993		A07_contig00002	1071	1.30%	100%	4 (HA)	CY125728.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465631		A07_contig00003	45980	55.10%	100%	7 (MP)	CY125731.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465632		A07_contig00004	24953	29.90%	100%	8 (NS)	CY125732.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465633		A07_contig00005	3072	3.70%	100%	5 (NP)	JX465633.1	98	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)
JX465634		A07_contig00006	486	0.60%	100%	2 (PB1)	CY125726.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465635		A07_contig00007	1581	1.90%	100%	1 (PB2)	KX289640.1	98	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-03191-16-CENASA-95076/2016(H7N3)
JX465636		A07_contig00008	514	0.60%	100%	3 (PA)	CY125727.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)

Este aislado obtuvo los mismos resultados de identidad de sus segmentos con el aislado 7, es por ello que también se obtiene que los segmentos 6,4,7,8,2 y 3 presentaron mayor porcentaje de identidad con la cepa A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3), y que el segmento 5 mostró una mejor identidad con la cepa A/chicken/Puebla/CPA-03191-16-CENASA-95076/2016(H7N3). Así mismo, se presentaron los mismos porcentajes de identidad para cada uno de sus segmentos, 98% de identidad para todos sus segmentos a diferencia de HA y NA que tiene un 97%. Todos los segmentos tienen coberturas del 100% (tabla 9).

Aislado 8

Tabla 10. Métricas aislado 8

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A08_contig00001	3456	4.10%	100%	6 (NA)	CY125730.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX397993		A08_contig00002	10953	13.10%	100%	4 (HA)	CY125728.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465631		A08_contig00003	18007	21.50%	100%	7 (MP)	CY125731.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465632		A08_contig00004	43842	52.30%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465633		A08_contig00005	5341	6.40%	100%	5 (NP)	JX465633.1	98	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)
JX465634		A08_contig00006; contig00007	119	0.10%	100%	2 (PB1)	CY125726.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465635		A08_contig00008; A08_contig00009	157	0.20%	99.27%	1 (PB2)	CY125725.1	98	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465636		A08_contig00010; A08_contig00011	119	0.10%	100%	3 (PA)	CY125727.1	97	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)

Este aislado mostró que para casi todos sus segmentos (a excepción de NP) el mejor match fue con la cepa A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3), por el contrario, el segmento 5 que corresponde a NP tiene un mejor porcentaje de identidad con la cepa A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3). Los que mayor porcentaje de identidad presentaron fueron los segmentos MP y NS con 99%. El segmento 1 (PB2) presento el menos porcentaje de cobertura con 99,27% comparado con los otros segmentos que tienen un 100% (tabla 10).

Aislado 9.

Tabla 11. Métricas aislado 9

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A09_contig00001	3437	3.40%	100%	6 (NA)	KX351910.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX397993		A09_contig00002	12226	12%	100%	4 (HA)	KR821169.1	99	Avian	A/chicken/Guanajuato/07437-15/2015(H7N3)
JX465631		A09_contig00003	31880	31.40%	100%	7 (MP)	KX351927.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465632		A09_contig00004	44174	43.50%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465633		A09_contig00005	7542	7.40%	100%	5 (NP)	KX351901.1	99	Avian	A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465634		A09_contig00006	168	0.20%	100%	2 (PB1)	KX351932.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-04148-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465635		A09_contig00007; A09_contig00008	463	0.50%	100%	1 (PB2)	KX351905.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465636		A09_contig00009	279	0.30%	90.77%	3 (PA)	KX351907.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)

Los segmentos de este genoma presentaron diversas asociaciones con otras cepas, segmentos NA, PB2 y PA tienen mayor porcentaje de identidad con la cepa A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3), la cepa A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3) se asoció a los segmentos MP y PB1, para el caso de HA se asoció a la cepa A/chicken/Guanajuato/07437-15/2015(H7N3), NP con A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016(H7N3) y NS con A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3). Todos los segmentos presentaron porcentajes de identidad del 99%. El segmento 3 (PA) es que tiene un menor porcentaje de

cobertura con el 90.77% en comparación con los otros segmentos que presentan un 100% (tabla 11)

Aislado 10

Tabla 12. Métricas aislado 10

Reference	Description	Contig	Number of reads	% reads	% coverage	Segment	Best hit on Blastn	% identity	Origin	Description
JX317626	A/chicken/Jalisco/CPA1/2012(H7N3)	A10_contig00001	11486	5.80%	100%	6 (NA)	KX351910.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX397993		A10_contig00002	25851	13.10%	100%	4 (HA)	KR821169.1	99	Avian	A/chicken/Guanajuato/07437-15/2015(H7N3)
JX465631		A10_contig00003	61605	31.10%	100%	7 (MP)	KX351927.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465632		A10_contig00004	78383	39.60%	100%	8 (NS)	CY125732.1	99	Human	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)
JX465633		A10_contig00005	17226	8.70%	100%	5 (NP)	KX351901.1	99	Avian	A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465634		A10_contig00006	437	0.20%	100%	2 (PB1)	KX351932.1	99	Avian	A/chicken/Puebla/CPA-04148-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465635		A10_contig00007	1440	0.70%	100%	1 (PB2)	KX351905.1	99	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)
JX465636		A10_contig00008	500	0.30%	100%	3 (PA)	KX351907.1	98	Avian	A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)

Este aislado presenta iguales resultados que el aislado 9, ya que se presentan los mismos match, NA, PB2 y PA con la cepa A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3), la cepa A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3) con MP y PB1, para el caso de HA se asoció a la cepa A/chicken/Guanajuato/07437-15/2015(H7N3), NP con A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016(H7N3) y NS con A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3). Todos los segmentos presentaron porcentajes de identidad del 99% a excepción del segmento 3 que fue del 98%. Todos los segmentos presentan un 100% de cobertura (tabla 12).

6.2 Mutaciones

Identificar las mutaciones en las moléculas de hemaglutinina y Neuraminidasa con respecto al genoma de referencia de ensamble y con el genoma de referencia empleado para el desarrollo de la vacuna para el tratamiento de los pollos durante el brote, ayuda a comprender que tan distantes son estos dos genomas comparados con los 10 genomas de interés, porque mutaciones en estas dos moléculas pueden desencadenar un escape del sistema inmune del hospedero, para el caso de hemaglutinina, y resistencia a fármacos antivirales para el caso de la neuraminidasa.

6.2.1 Hemaglutinina

Al compararse con el genoma de referencia (Código de acceso al Genbank: JX397993) se presentaron las siguientes mutaciones en HA (Tabla 13)

Tabla 13. Mutaciones presentes en cada uno de los 10 aislados que difieren con el genoma de referencia.

HA	
Isolate	Number mutations
1	26
2	20
3	21
4	20
5	27
6	24
7	24
8	20
9	26
10	26

En total se identificaron 67 mutaciones no redundantes en diferentes posiciones para el total de aislados, de las cuales 52 corresponden al dominio globular (HA1) y

15 al tallo (HA2)

Al compararse con el genoma de referencia para la cepa de la vacuna (Código de acceso al Genbank: KC669389) se presentaron las siguientes mutaciones en HA (tabla 14).

Tabla 14. Mutaciones presentes en cada uno de los 10 aislados que difieren con el genoma de referencia empleado para la vacuna.

HA	
Isolate	Number mutations
1	38
2	32
3	33
4	32
5	39
6	34
7	34
8	32
9	38
10	38

En total se identificaron 77 mutaciones para el total de aislados, de las cuales 62 corresponden al dominio globular (HA1) y 15 al tallo (HA2)

6.2.2. Neuraminidasa

Al compararse con el genoma de referencia (Código de acceso al Genbank: JX317626) se identificaron las siguientes mutaciones (Tabla 15)

Tabla 15. Mutaciones presentes en cada uno de los 10 aislados que difieren con el genoma de referencia.

NA	
Isolate	Number mutations
1	9
2	12
3	7
4	10
5	13
6	12
7	12
8	7
9	10
10	11

Al compararse con el genoma de referencia para la cepa de la vacuna (Código de acceso al Genbank: KC669386) se presentaron las siguientes mutaciones en NA (tabla 16)

Tabla 16. Mutaciones presentes en cada uno de los 10 aislados que difieren con el genoma de referencia empleado para la vacuna.

NA	
Isolate	Number mutations
1	18
2	19
3	18
4	21
5	21
6	22
7	22
8	18
9	18
10	18

6.2.3 Mutaciones exclusivas son al compararse con el genoma de referencia para cada una de las moléculas de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de los 10 aislados

Cuando se compararon los genomas de los aislados con el de la vacuna que se emplea actualmente, se encontró que 12 mutaciones eran exclusivas para HA y 15 para NA (tabla 17)

Tabla 17. Mutaciones exclusivas al compararse con el genoma de la vacuna KC669389 para HA y KC669386 para NA

HA	NA
V7A	I50T
F8L	V69I
T16A	R211K
K40R	N249S
V54A	N249G
V56T	V255I
A198T	N268D
L274I	I286V
S293N	M334V
A310T	D357N
A499T	D357K
T503A	D357H
	V397M
	V397I
	R467M

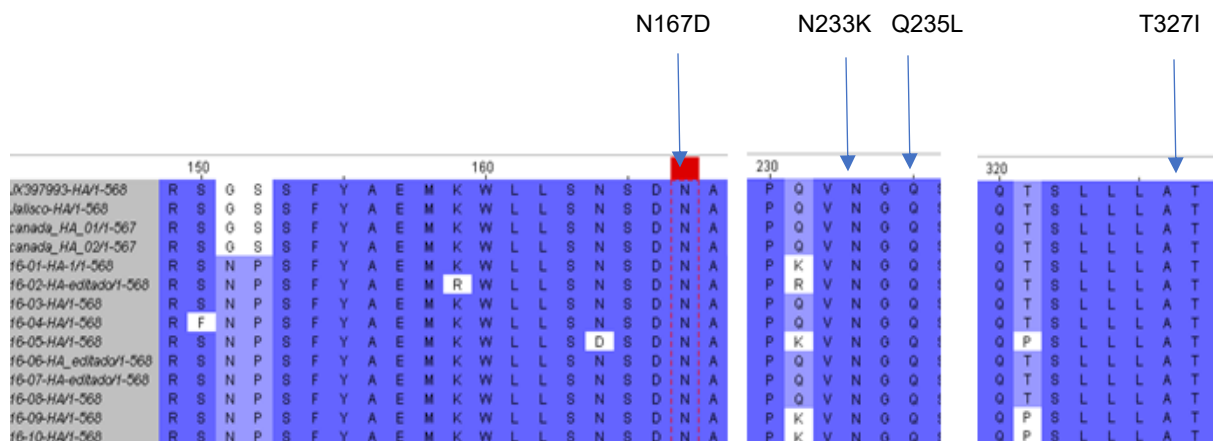
6.2.4. Comparación de segmento de Hemaglutinina (H7) tomados de granjeros infectados con la cepa H7N3 y los segmentos de hemaglutinina de los 10 aislados de interés.

Tabla 18. Descripción de los segmentos de HA tomados de los humanos infectados

	Descripción	Código acceso al Genbank	Origen	País
Aislamientos	A/chicken/British Columbia/04(H7N3)	AY611524	Humano	Canadá
	A/chicken/British Columbia/GSC_human_B/04(H7N3)	AY646078	Humano	Canadá
	A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	CY125728	Humano	México

De las secuencias, se compararon las mutaciones que según estudios reportados por Imai, et al. 2012 [41]; Herfst, et al. 2012 [42]; Russell, et al. 2012 [43], confieren un cambio de afinidad por el ácido siálico $\alpha 2, 6$ que permite transmisión por vía aérea e infectar mamíferos. Los alineamientos generados muestran lo siguiente:

Figura 3. Representación de las secuencias de hemaglutinina del subtipo H7 de los casos reportados humanos comparados con los segmentos de los genomas de interés.



JX397993-HA: Segmento de hemaglutinina del genoma de referencia de ensamble

Jalisco-HA: Segmento de hemaglutinina de humano infectado con H7N3 en México (A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3))

Canada_HA_01: Segmento de hemaglutinina de humano infectado con H7N3 en Canadá (A/chicken/British Columbia/04(H7N3))


Canada_HA_02: Segmento de hemaglutinina de humano infectado con H7N3 en Canadá (A/chicken/British Columbia/GSC_human_B/04(H7N3))

16_01-10-HA: Segmento de hemaglutinina de los diez aislados.

6.3. Modelos tridimensionales para las proteínas de Hemaglutinina y Neuraminidasa


Se realizó un modelado estructural para generar un modelo tridimensional, uno para la molécula de Hemaglutinina y otro para la molécula de Neuraminidasa. La finalidad de la generación de tales modelos es para registrar y visualizar las mutaciones y de qué manera están distribuidas en las moléculas de HA y NA

6.3.1 Hemaglutinina

Template	Seq Identity	Coverage	Description
3m5j.1.A	86.62%		Hemagglutinin

52% cobertura.

Yang H, *et al.* Structures of receptor complexes of a North American H7N2 influenza hemagglutinin with a loop deletion in the receptor binding site. 2010. PloS pathogens. [44]

Template	Seq Identity	Coverage	Description
2yp2.1.A	49.00%		HEMAGGLUTININ

88% cobertura.

Lin YP, *et al.* Evolution of the receptor binding properties of the influenza A (H3N2) hemagglutinin. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. [45]

6.3.2 Neuraminidasa

Template	Seq Identity	Coverage	Description
4hzv.1.A	95.09%		Neuraminidase



Li Q, *Et al.* Functional and structural analysis of influenza virus neuraminidase N3 offers further insight into the mechanisms of oseltamivir resistance. 2013. J Virol. [46]

6.4. Modelos estructurales con el mapeo de las mutaciones encontradas en cada una de las proteínas.






10-20%	
30-40%	
50-60%	
70-80%	
90-100%	

Tabla de colores que indica el porcentaje de mutaciones para cada uno de los aislados, siendo verde donde ocurrieron mutaciones solo en 1 o en 2 de los aislados y siendo rojo donde las mutaciones ocurrieron en 9 o en todos los aislados.

6.4.1. Hemagglutinina

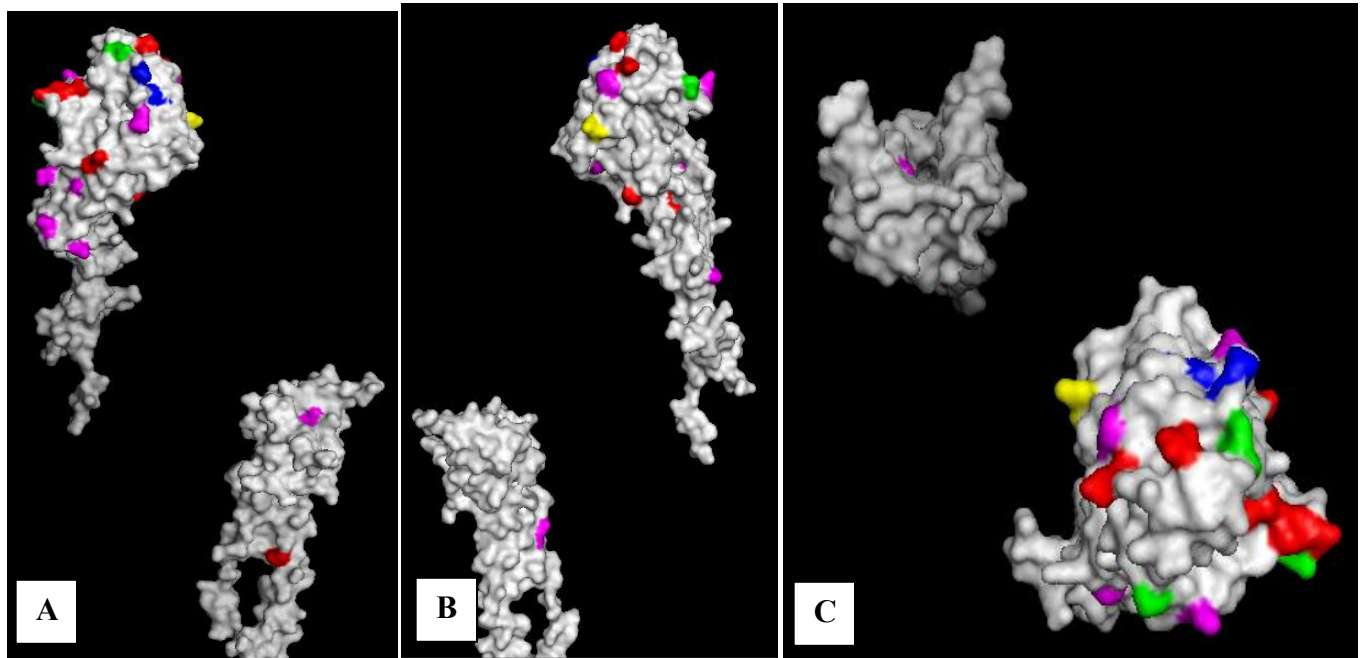


Figura 4. Mutaciones en HA en comparación a JX397993. A y B vista lateral de la molécula. C molécula vista desde la parte superior.

En la figura 4 se ve que todas las mutaciones de registra en el dominio globular y muy pocas en el dominio del tallo.

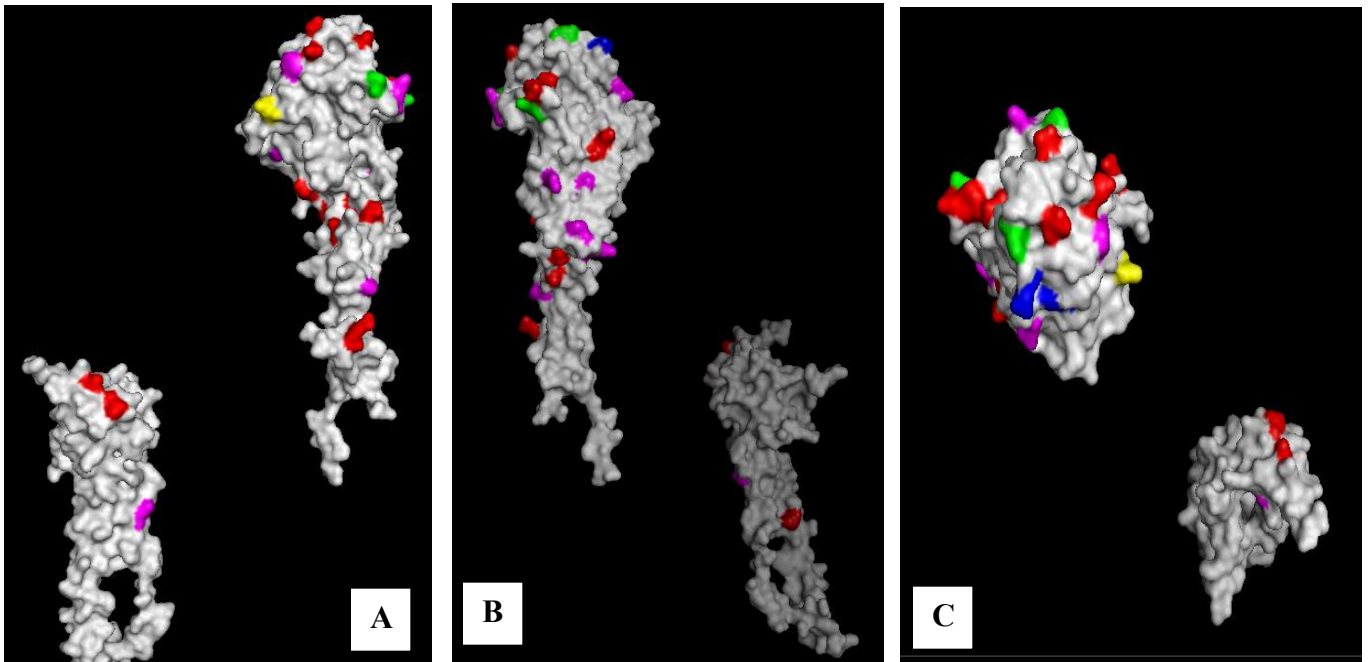


Figura 5. Mutaciones en HA en comparación con KC669389 (referencia Vacuna). A y B vista lateral de la molécula. C molécula vista desde la parte superior.

En la figura 5 se evidencia que además de presentar la mayoría de mutaciones en el dominio globular, se incrementan el número de mutaciones en este dominio.

6.4.2. Sitio de unión al receptor (RBS)

Con la finalidad de analizar mutaciones relevantes en el sitio de unión al receptor, se mapearon las mutaciones donde se encontraron cambios en la secuencia en cada uno de los dos loops y de la hélice alfa que conforman el sitio de unión del receptor del ácido siálico.

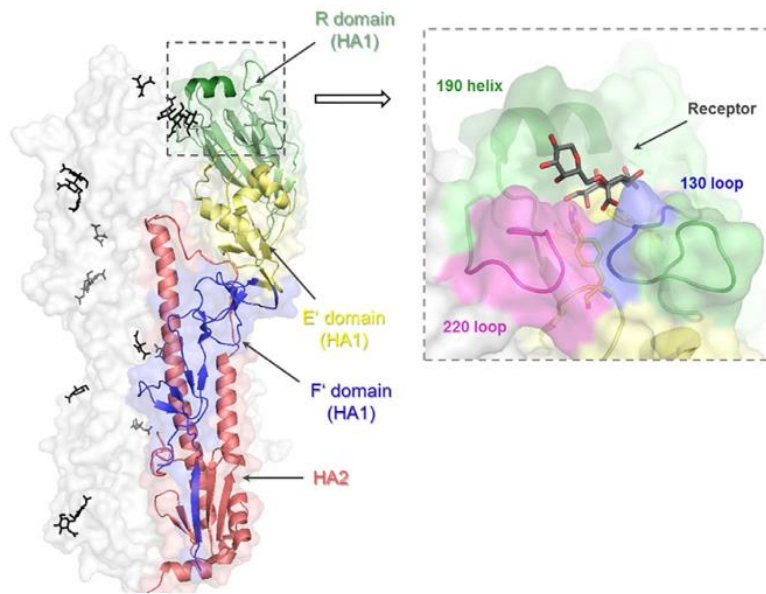


Figura 6. Sitio de unión al receptor. A. Representación del RBS por Mair *et al.* [13]

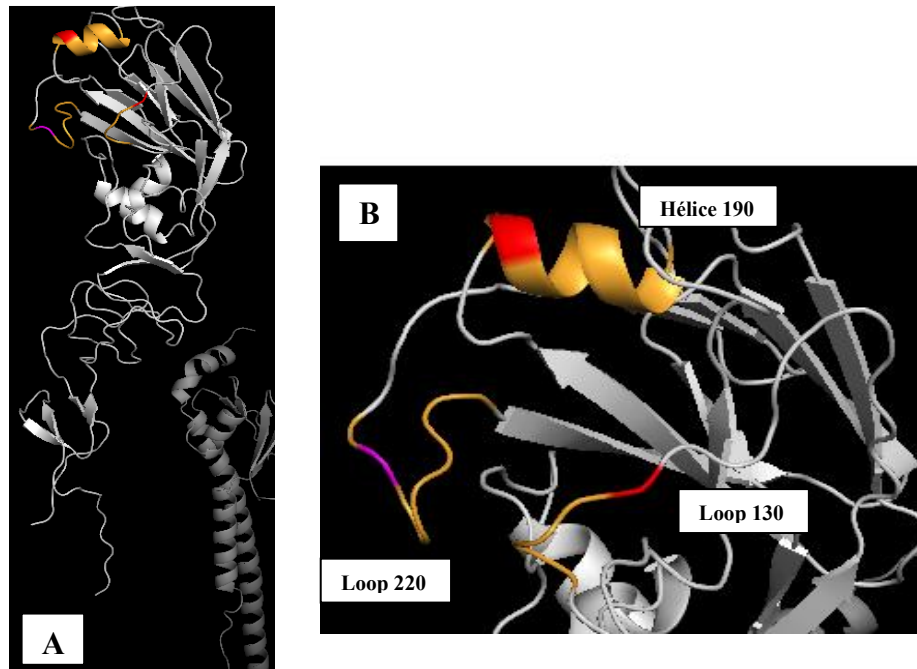


Figura 7. A. Vista de la molécula de HA donde se colorea de color naranja los loops de RBS. B. vista de cerca del cada uno de los 3 loops que conforman al RBS, en rojo y morado la mutación correspondiente a cada uno de los dos loops y la hélice

Se visualizan las siguientes mutaciones

Loop 130: mutación A143T (todos los aislados)

Hélice 190: mutación A198T (todos los aislados)

Loop 220: Q231K (Aislados 1, 5, 9 y 10)

6.4.3. Neuraminidasa

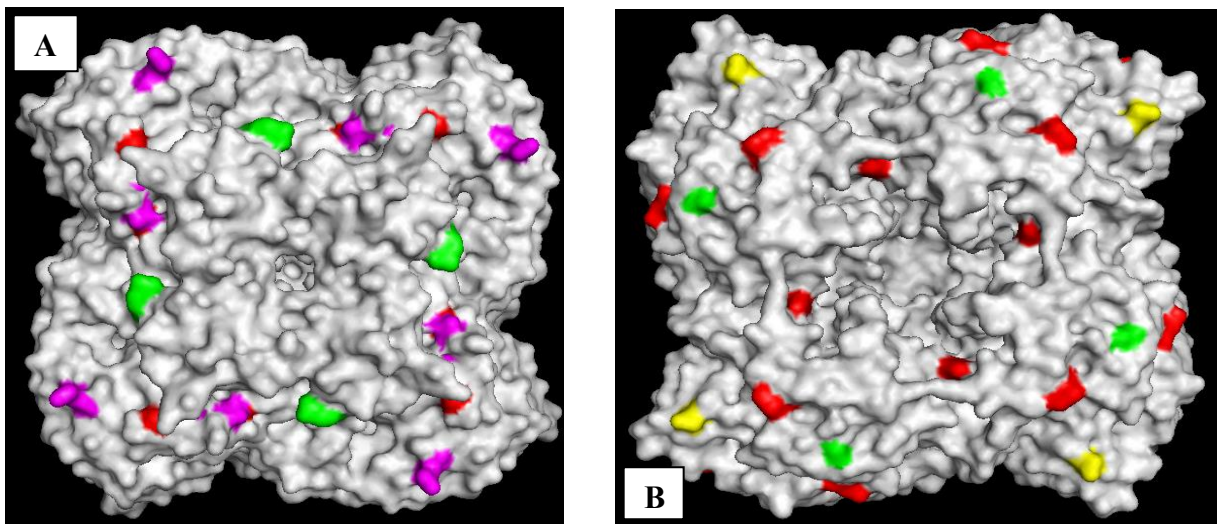


Figura 8. Mutaciones en NA en comparación a KC669386 (referencia Vacuna). A. Cara de la molécula que está unida al virión. B cara de la molécula que mira hacia afuera del virión.

En la figura 8 se observa que la mayoría de las mutaciones que se encuentran en todos los aislados se reportan para la cara de la molécula que mira hacia afuera del virion, la cara que está expuesta.

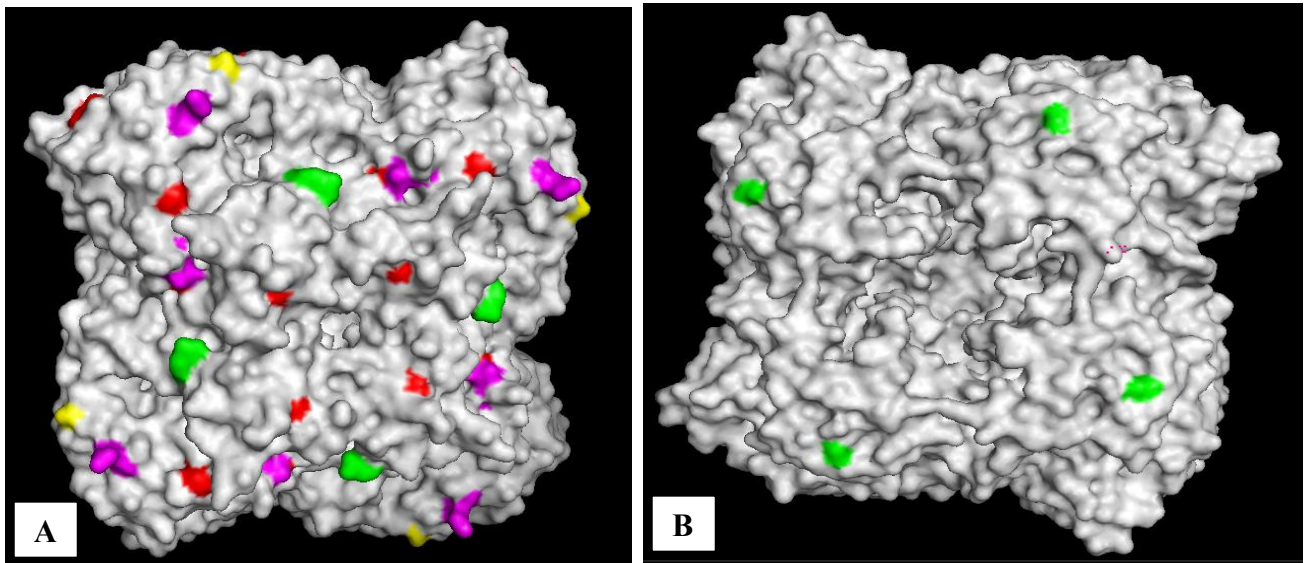


Figura 9. Mutaciones en NA en comparación con JX317626 (Genoma de referencia de ensamblaje). A. Cara de la molécula que está unida al virión. B. Cara de la molécula que mira hacia afuera del virión.

En la figura 9, la mayoría de las mutaciones se registran para la cara que mira hacia el virión.

Se encontraron 3 loops en cada uno de los monómeros que conforman a esta proteína, estos loops fueron reportados por Qing L, *et al.* [46]

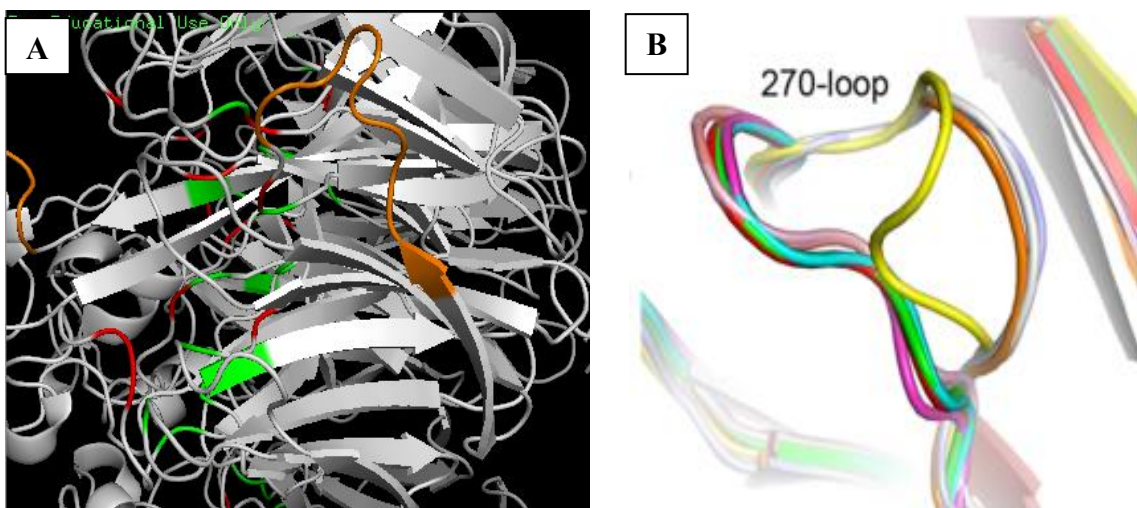


Figura 10. A. Loop 270 en naranja para molécula de interés de NA. B. Loop 270

en amarillo reportado por Qing L, et al. [46]

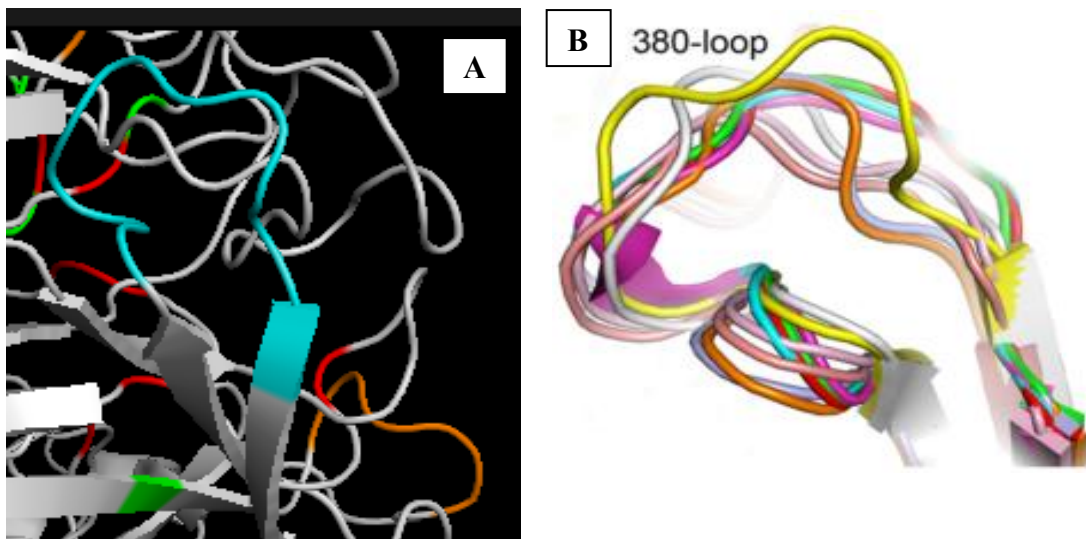


Figura 11. A. Loop 380 en azul para molécula de interés de NA. B. Loop 380 en amarillo reportado por Qing L, et al. [46]

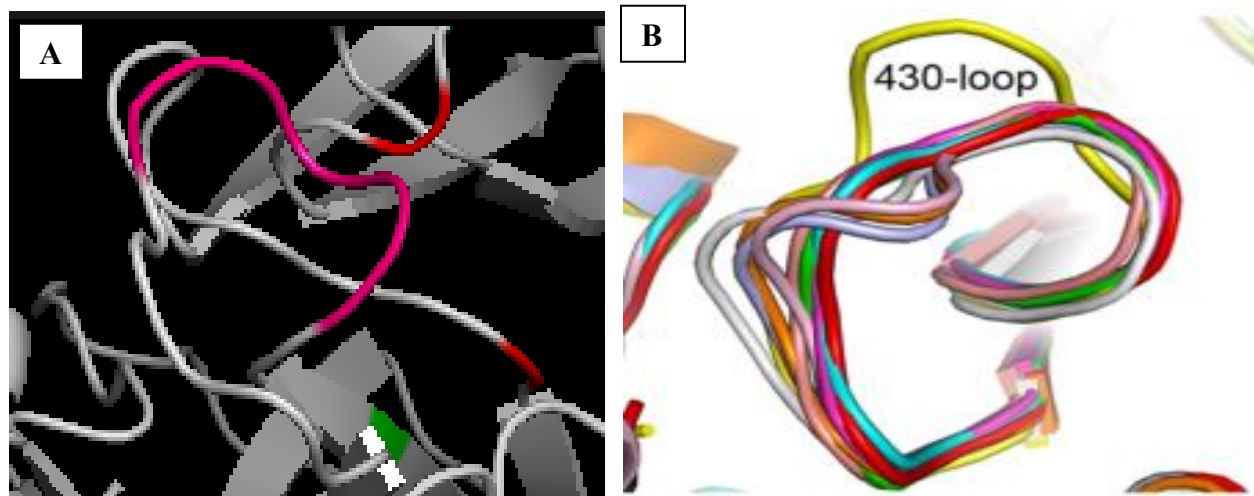


Figura 12. A. Loop 430 en rosapara molécula de interés de NA. B. Loop 430 en amarillo reportada por Qing L, et al. [46]

6.5 Análisis filogenético

6.5.1 Phypipe

Con el objetivo de conocer las relaciones filogenéticas entre los aislados del brote en México se realiza una filogenia empleando los genes HA, NP, NA, MP, en donde se obtuvieron las topologías reportadas en las figuras 13 y 14, donde se identifican 3 grupos:

Grupo A: Aislado 01, aislado 05, aislado 09 y aislado 10

Grupo B: Aislado 02, aislado 03, aislado 04, aislado 08

Grupo C: Aislado 06, aislado 07

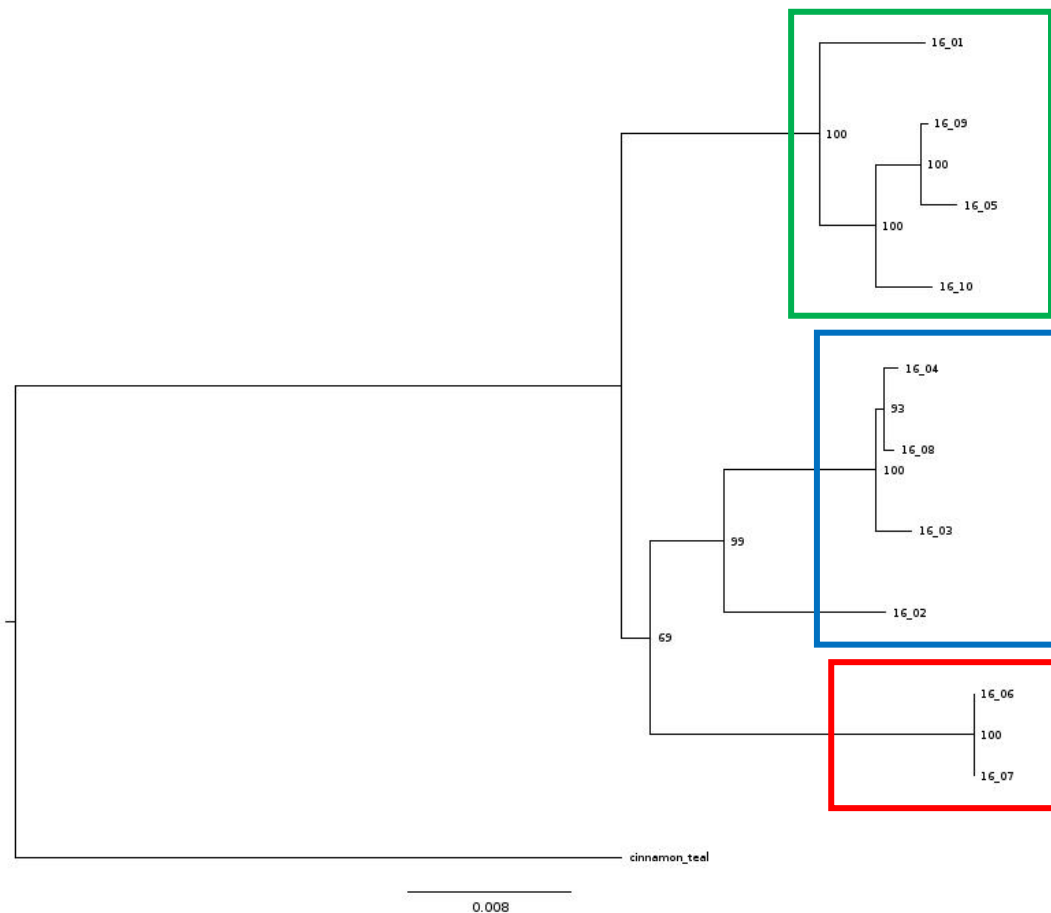


Figura 13. Filogenia realizada con los 10 genomas de influenza H7N3 mediante Phypipe [40] empleando método de máxima verosimilitud (RaxML), se muestra la agrupación de los 10 aislados. Grupo A en recuadro verde, grupo B en recuadro azul, grupo C en recuadro rojo.

La filogenia de la figura 13 revelo que los genomas de interés se distribuyen en 3 grupos.

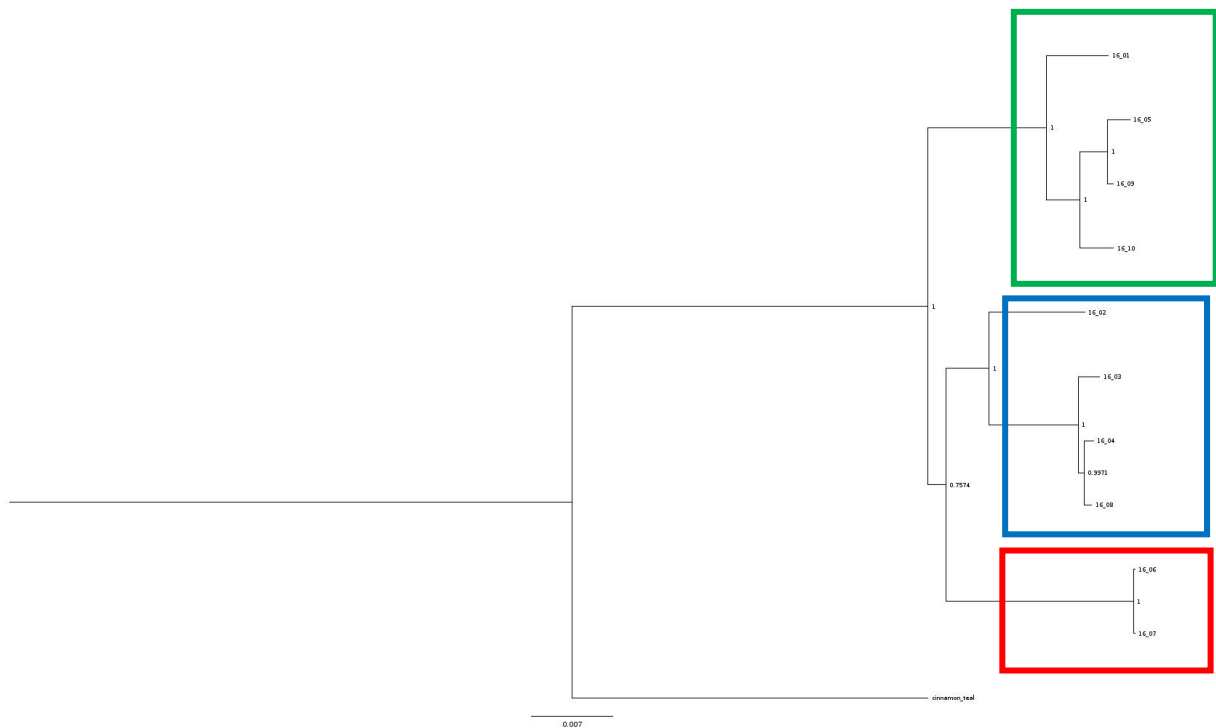


Figura 14. Filogenia realizada con los 10 genomas de influenza H7N3 mediante Phypipe [40] empleando método de inferencia bayesiana (MrBayes), se muestra la agrupación de los 10 aislados. Grupo A en recuadro verde, grupo B en recuadro azul, grupo C en recuadro rojo.

La topología generada por MrBayes (Figura 14) reporta que al igual que la que se generó por RaxML (figura 13), los 10 aislados se agrupan en los mismos tres grupos.

6.5.2. Filogenias con genomas de Genbank y los genomas de interés.

Con la finalidad de comprender las relaciones filogenéticas de los genomas de interés del brote en México con otros genomas del subtipo H7N3 se realizaron las filogenias reportadas en las figuras 15 y 16. Las secuencias empleadas para la elaboración de las filogenias (a excepción de los 10 genomas de este estudio) se tomaron del Genbank.

Tabla 19. Numero de genomas empleados del Genbank con sus respectivos países de origen (ingroup)

Numero de genomas tomados del Genbank	País
2	Australia
1	Bolivia
13	Canadá
2	Chile
9	China
1	Finlandia
1	Georgia
1	Guatemala
2	Italia
1	Japón
5	México
2	Mongolia
2	Países bajos
4	Pakistán
1	Perú
1	Portugal
6	Corea del sur
1	Emiratos Árabes Unidos
3	Reino Unido
68	Estados Unidos

Tabla 20. Descripción del grupo externo empleado en las filogenias presentadas.

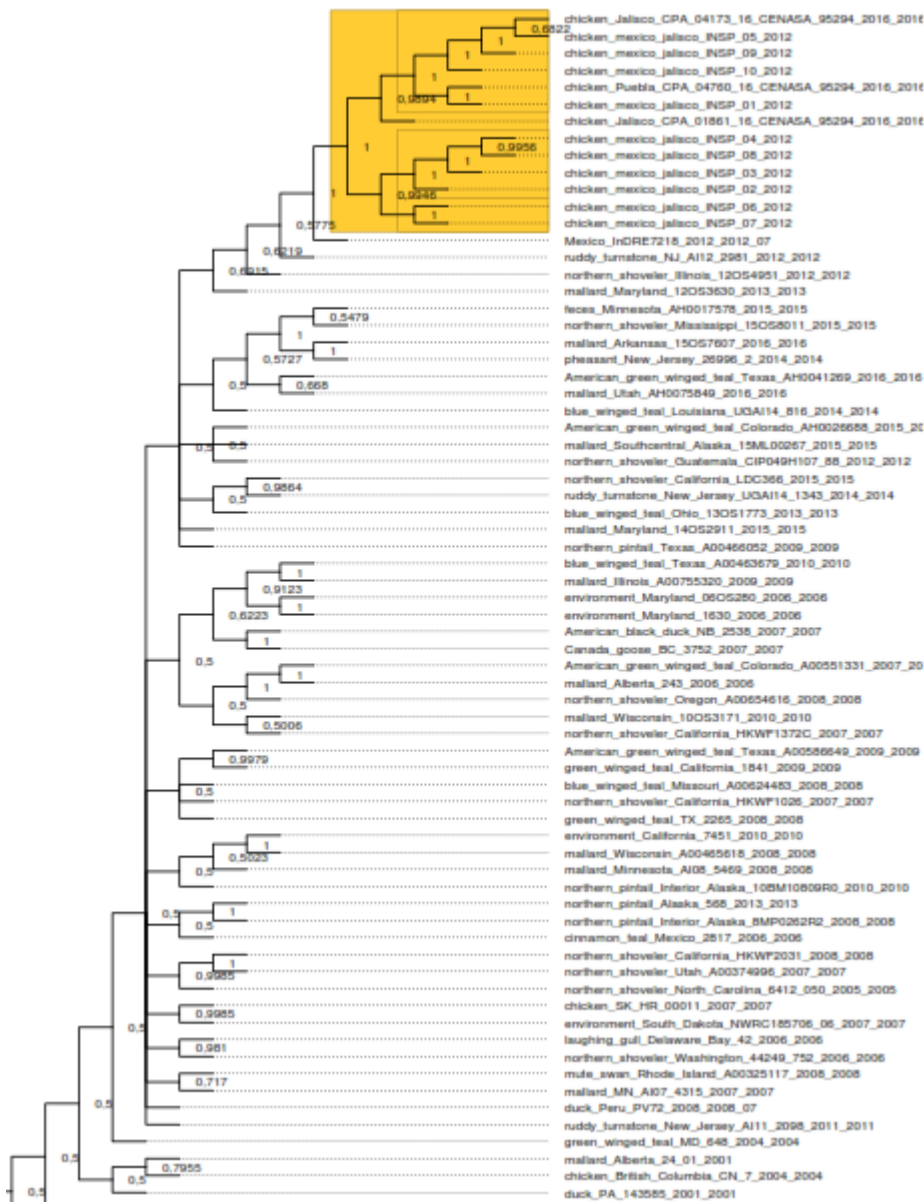
	Descripción	Cepa Influenza	Origen	País
Grupo externo	A/AA/Marton/1943(H1N1)	H1N1	Humano	USA
	A/Aalborg/INS132/2009(H1N1)	H1N1	Humano	Dinamarca

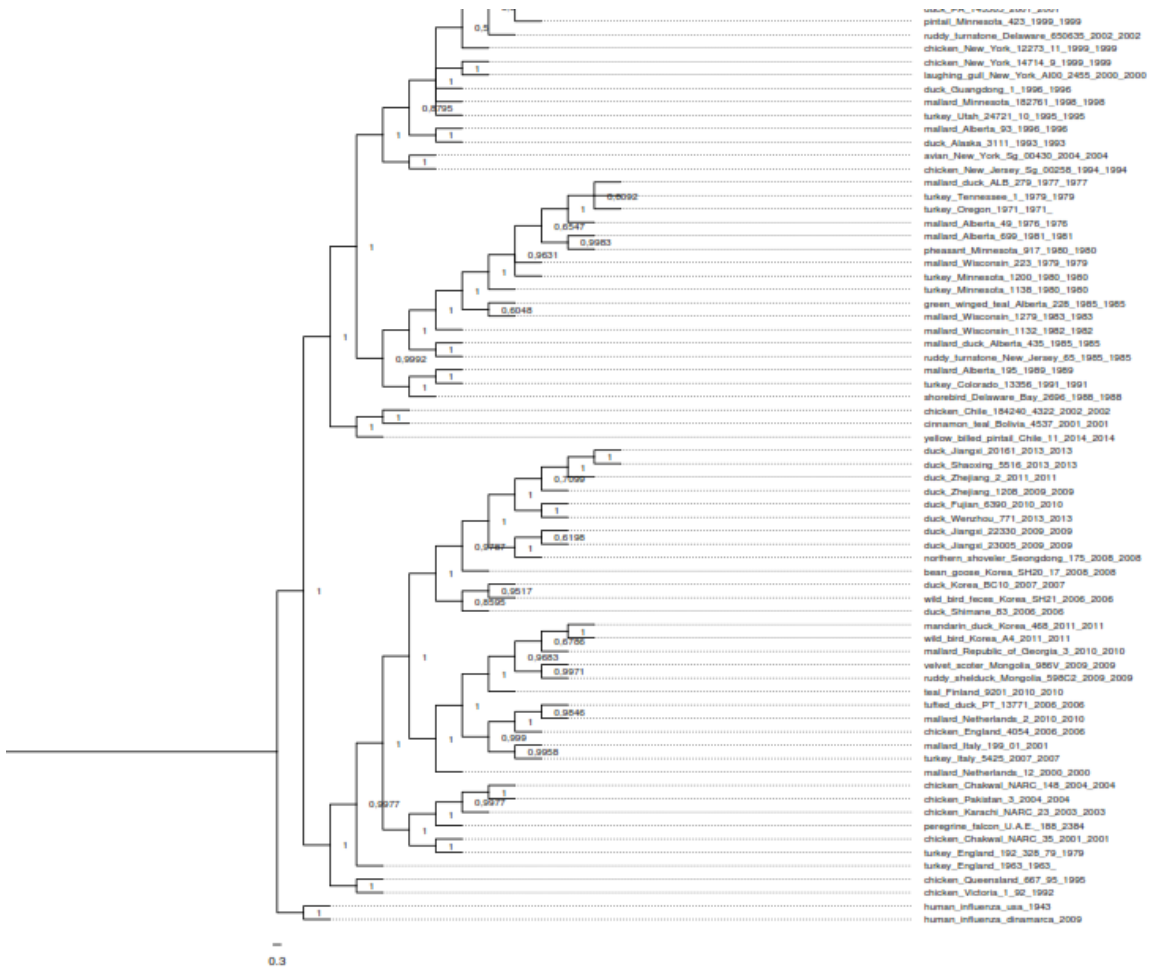
Tabla 21. Numero de secuencias tomadas del Genbank para cada segmento del genoma de influenza (incluye el grupo externo)

segmento genoma Influenza H7N3	Numero de secuencias usadas
PB2	97
PB1	96
PA	100
HA	128
NP	99
NA	100
MP	99
NS	99

6.5.2.1. Filogenia generada por método de inferencia bayesiana

Figura 15. Resultado árbol filogenético elaborado por Mr bayes. El grupo de interés se muestra resaltado de color amarillo.





6.5.2.2. Filogenia generada por método de máxima verosimilitud.

Figura 16. Resultado árbol filogenético elaborado mediante RaML. El grupo de interés se muestra resaltado de color amarillo.

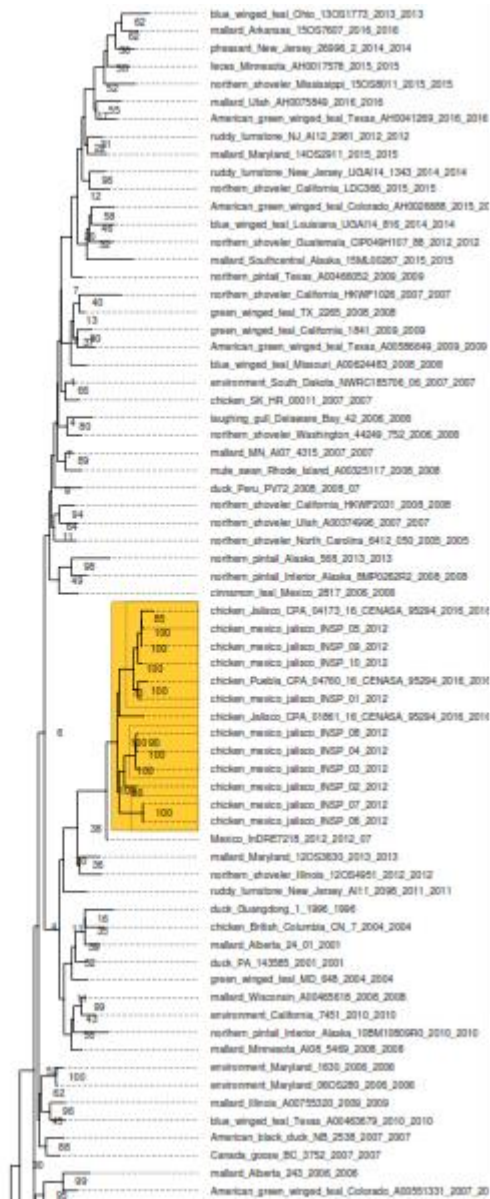
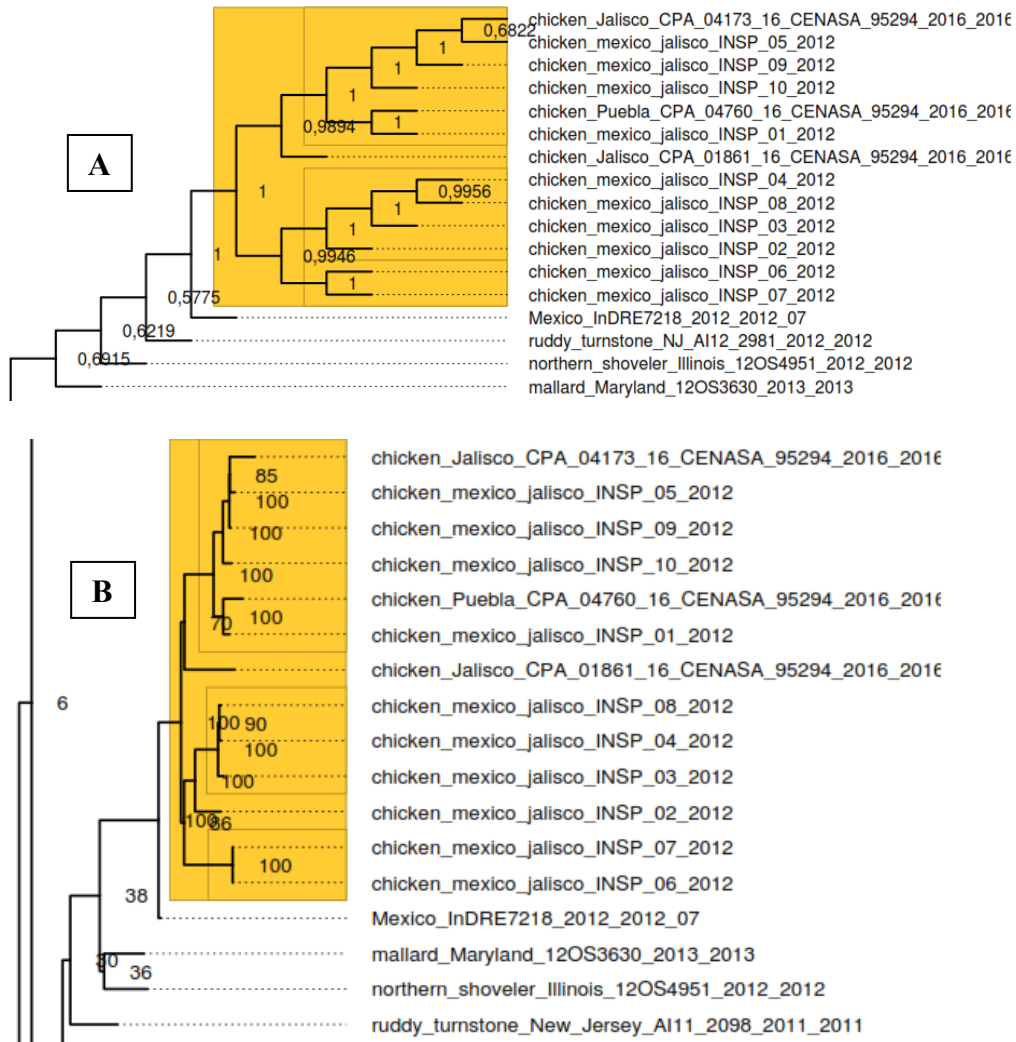


Figura 17. Topologías de los grupos de interés generadas por el método de A. inferencia bayesiana y B. máxima verosimilitud



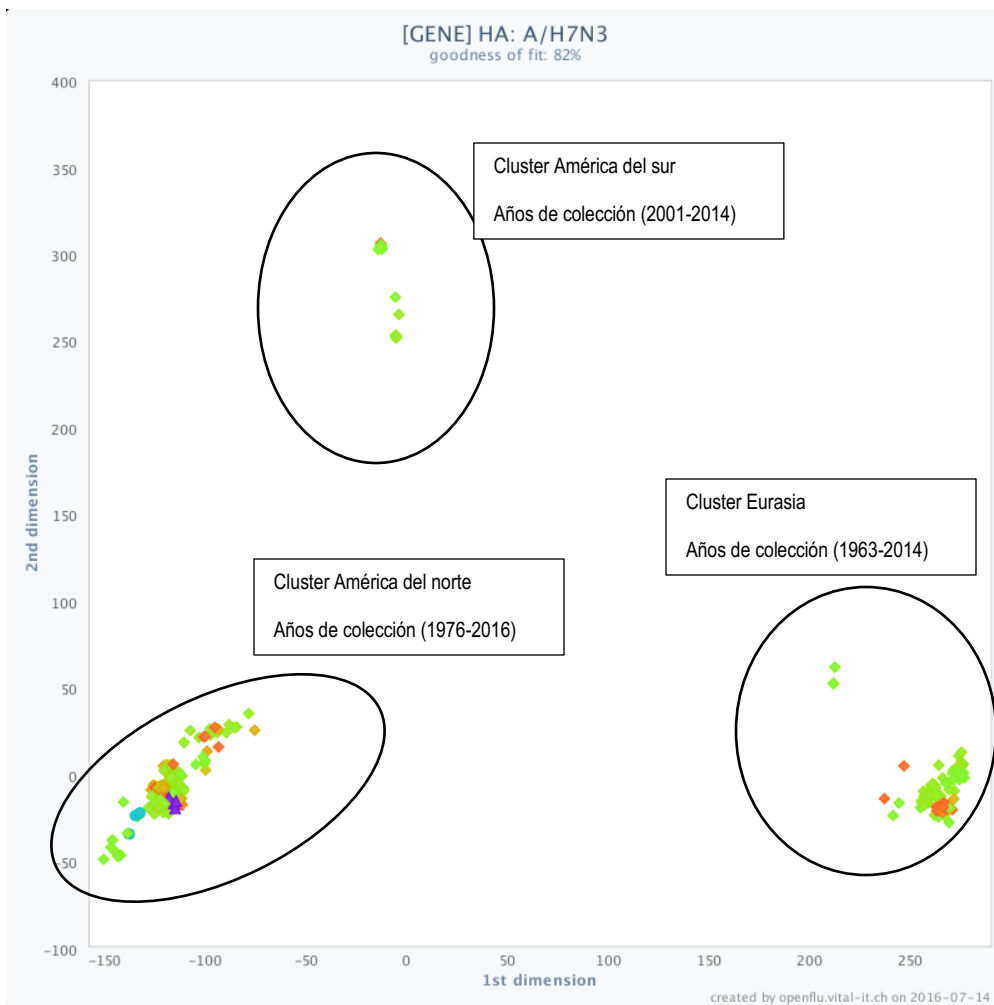
6.6 Mapa de similitud de secuencia

Este análisis se realiza con la finalidad de conocer los clusters de secuencias de H7 más similares a los genomas de la tabla 22 que subsecuentemente guardarán estrecha relación con los 10 genomas presentados en este análisis.

Tabla 22. Aislados que presentaron una cercanía filogenética con los genomas de interés

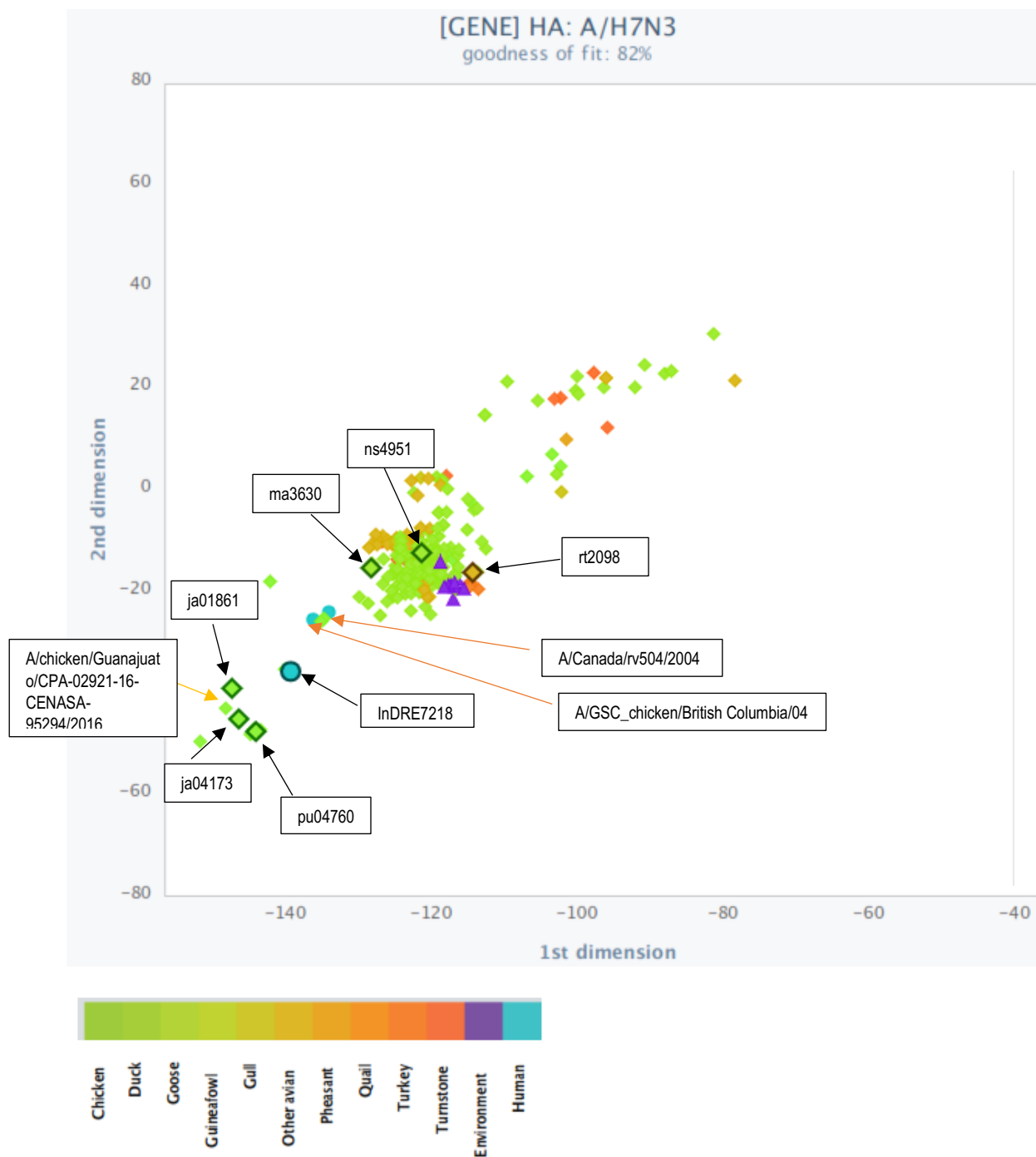
Descripción	País de origen	Código en SSM
A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	México	ja04173
A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	México	pu04760
A/chicken/Jalisco/CPA-01861-16-CENASA-95294/2016(H7N3)	México	ja01861
A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3)	México	InDRE7218
A/ruddy turnstone/NJ/AI12-2981/2012(H7N3)	USA	rt2981
A/ruddy turnstone/New Jersey/AI11-2098/2011(H7N3)	USA	rt2098
A/northern shoveler/Illinois/12OS4951/2012(H7N3)	USA	ns4951
A/mallard/Maryland/12OS3630/2013(H7N3)	USA	Ma3630

Figura 18. Mapa de similitud de secuencias de H7N3 con las secuencias más cercanamente relacionadas con los 10 genomas.



En la figura 18 se observa la formación de tres grandes clusters en donde se agrupan las cepas mapeadas de H7N3.

Figura 19. Mapa de similitud de secuencias de H7N3 con las secuencias más cercanamente relacionadas con los 10 genomas, se muestran señaladas aquellas de interés reportadas en la tabla 22.



En el mapa de la figura 19, las flechas color negro señalan los segmentos de la tabla 22, a su vez, se observan los segmentos señalados con flechas naranja que están más cercanos en similitud de secuencia a los de la tabla 22.

6.7. Sitios de N-glicosilación en HA.

Un análisis de los sitios de N-glicosilación permite determinar si existen nuevos sitios de esta naturaleza que estén involucrados en un escape al sistema inmune del hospedero.

De acuerdo con el análisis de sitios de glicosilación generados en cada proteína de hemaglutinina de los 10 aislados se encontraron los siguientes.

Tabla 23. Sitios de N-glicosilación para aislados de influenza H7N3

Putative N-glycosylation sites								
		HA1						HA2
		30	46	141	151	182	249	501
	Reference	NGTK	NATE				NDTV	NNTY
Group A	16-01-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF	NKSA	NDTV	NNTY
	16-05-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF	NKSA	NDTV	NNTY
	16-09-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF	NKSA	NDTV	NNTY
	16-10-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF	NKSA	NDTV	NNTY
Group B	16-02-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF		NDTV	NNTY
	16-03-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF		NDTV	NNTY
	16-04-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF		NDTV	NNTY
	16-08-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF		NDTV	NNTY
Group C	16-06-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF		NDTV	NNTY
	16-07-HA	NGTK	NATE	NGTT	NPSF		NDTV	NNTY

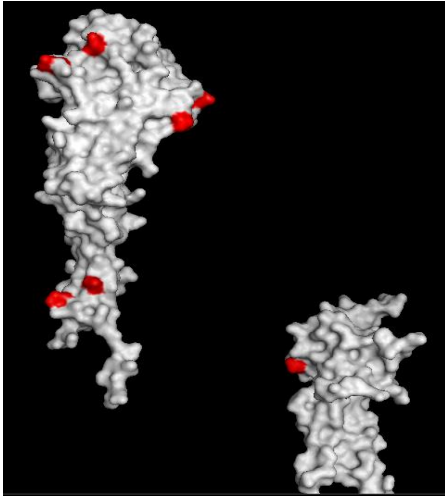


Figura 20. Representación en modelo de hemaglutinina donde se ubican en color rojo los sitios de N-glicosilación.

Este análisis evidencia que para la molécula de hemaglutinina se reportaron 3 nuevos sitios de N-glicosilación para el grupo A de los aislados y dos nuevos sitios para los grupos B y C.

6.8. Selección.

Con la finalidad de comprender a qué tipo de selección (Positiva, negativa o neutral) estaba sometida la molécula de hemaglutinina, se realizó el siguiente análisis.

HA: Molécula de hemaglutinina completa

HA1: Dominio globular de hemaglutinina

HA2: Dominio de tallo de hemaglutinina

Tabla 24. Tasa de mutaciones no sinónimas y sinónimas comparadas con el genoma de referencia.

Mutations synonymous and non-synonymous (dN/dS) Reference (JX397993)				
		HA	HA1	HA2
	Isolate			
Group A	16-01-HA	0,8	1,5	0,12
	16-05-HA	0,95	1,26	0,3
	16-09-HA	0,9	1,26	0,27
	16-10-HA	0,84	1,2	0,25
Group B	16-02-HA	0,88	1,38	0,38
	16-03-HA	0,77	0,83	0,66
	16-04-HA	0,8	1	0,44
	16-08-HA	0,75	0,88	0,55
Group C	16-06-HA	0,87	0,95	0,66
	16-07-HA	0,87	0,95	0,66

En la tabla 24 se puede observar que para todos los aislados del grupo A, el dominio globular (HA1) presenta selección positiva, al igual que los aislados 2 y 4 del grupo B.

Tabla 25. Tasa de mutaciones no sinónimas y sinónimas comparadas con el genoma de referencia para la vacuna.

Mutations synonymous and non-synonymous (dN/dS) Vaccine Reference KC669389				
		HA	HA1	HA2
	Isolate			
Group A	16-01-HA	0,47	3,57	0,42
	16-05-HA	0,49	3,3	0,5
	16-09-HA	0,48	3,5	0,5
	16-10-HA	0,47	3,6	0,5
Group B	16-02-HA	0,44	4,2	0,5
	16-03-HA	0,42	3,8	0,6
	16-04-HA	0,42	3,8	0,58
	16-08-HA	0,42	3,8	0,6
Group C	16-06-HA	0,43	4,17	0,46
	16-07-HA	0,43	4,17	0,46

En la tabla 25, se evidencia que para todos los aislados, el dominio globular presenta una fuerte selección positiva.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los 10 aislados de H7N3, tomados del brote presentado en Jalisco (México) en el año 2012, mostraron mayor identidad con los aislados de origen de los estados de Puebla, Guanajuato, Jalisco, en él cual se encuentra el genoma A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3) que se reporta de origen humano por tratarse de un caso de una infección a un granjero durante este brote [50]. El aislado 5 fue el que presentó mayores porcentajes de identidad con cinco cepas a lo largo de sus 8 segmentos, lo anterior con base a lo reportado por Blastn (ver sección 6.2)

Según este apartado, existe un posible re-arreglo entre los segmentos de los diez aislados, lo anterior denotado por su relación a nivel de similitud de secuencias con diversas cepas.

Las mutaciones en la proteína de hemaglutinina de las 10 cepas aisladas en comparación al genoma de referencia fueron muy extensas, en total se identificaron 67 mutaciones de las cuales 52 corresponden al dominio globular (HA1) y 15 al tallo (HA2) (ver tabla 13), para el caso de la vacuna de referencia aumentaron en 10 mutaciones más, donde se identificaron 77 mutaciones totales de las cuales 62 corresponden a HA1 y 15 a HA2 (ver tabla 14). Para Neuraminidasa, fueron 41 mutaciones respecto al genoma de referencia (ver tabla 15) y 51 mutaciones en comparación a la referencia de la vacuna (ver tabla 16).

Al momento de observar las mutaciones que difieren en todos los aislados en comparación al genoma de referencia de la vacuna (Tabla 17) se observa que 12 mutaciones se registran en HA y 15 para NA, estas mutaciones son congruentes ya que el genoma con el cual se realizó la vacuna para controlar este brote [51] es reportado para el año 2006 y estas cepas que se trabajan en este informe son del año 2012, durante el periodo de 6 años se han presentado estas mutaciones que pueden aumentar la distancia antigénica, aunque se reportó que la vacuna cumplía

con brindar protección a los pollos, se necesita investigar sobre una mejor cepa semilla para el desarrollo de una nueva vacuna contra el virus de influenza de alta patogenicidad H7N3 que presenta mayor similitud con la cepa del brote y de esta manera tener una mejor inmunogenicidad o que presente una amplia inducción de es especificidad de anticuerpos.

En la comparación de los segmentos de hemaglutinina de los virus de H7N3 aislados de humanos y los segmentos de hemaglutinina de los genomas aquí presentados (sección 6.2.4), es importante resaltar que los segmentos de interés se encontraban altamente conservados para las mutaciones que pueden causar transmisión vía aerosol: N167D, N233K, Q235L, T327I (nomenclatura en H5, N158D, N224K, Q226L, T318I), estos residuos que se encuentran conservados, al mutar podría de manera teórica favorecer la unión de ácido siálico $\alpha 2,6$, el cual se encuentra en las células de mamíferos, contribuyendo a derribar la barrera de especie, estas mutaciones también favorece la transmisión humano-humano vía aérea. Sin embargo, aunque estas mutaciones no se registren en el set de datos, los genomas A/chicken/British Columbia/04(H7N3, A/chicken/British Columbia/GSC_human_B/04(H7N3), A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3), lograron transmitirse vía aerosol a humanos sin necesidad de tales mutaciones. Es por tanto, que se necesita un abordaje con mayor profundidad en análisis de estructuras cristalográficas de la hemaglutinina de estos genomas con respecto a los de este estudio para determinar su comportamiento a nivel de estructura, además de un contexto experimental para analizar su capacidad de infección.

El modelo tridimensional para hemaglutinina presentó un alto porcentaje de identidad (86.62%) basado en homologías por estructuras cristalográficas depositadas en PDB, el modelo que presento este porcentaje de identidad solo tenía reportado el dominio globular, es por tanto que sería interesante generar un modelo cristalográfico para la hemaglutinina de este brote y así tener una molécula completa. Par este estudio se empleó el tallo de HA del modelo 2yp2.

En neuraminidasa el modelo fue en un alto porcentaje (95.09%) fiel a la estructura de N3 del brote.

El mapeo de las mutaciones en la molécula de hemaglutinina (figuras 4 y 5) claramente muestra una alta proporción de sitios que han variado para el dominio globular en lugar del tallo, también se ve el mismo patrón para el caso de las mutaciones que difieren con la referencia de la vacuna (figura 5) donde adicional a la alta proporción de mutaciones en el dominio globular, se encuentran muchas en color rojo, lo cual indica que son sitios en donde varió en todos los aislados (mutaciones registradas en tabla 17), la región que interactúan el trómero no se ve muy afectada, lo cual es congruente con la presión positiva que se ejerce sobre la superficie de la molécula que está expuesta e interactuando con el sistema inmune de su hospedero.

Otro aspecto a resaltar son las mutaciones que se encuentran en el sitio de unión al receptor, ya que es en este dónde radica la especificidad del tipo de influenza debido a que el tipo de influenza en humanos prefiere el enlace ácido sálico (SA) unido a galactosa en $\alpha 2,6$ y la influenza de tipo aviar tiene preferencias por el enlace SA unido a galactosa en $\alpha 2,3$, para el caso de los cerdos se encuentran los dos tipos de enlaces por tanto, los cerdos son “recipientes de mezcla de virus”, son susceptibles a la infección por influenza humana y también por aviar, facilitando arreglos entre las diferentes cepas del virus, esto se facilita un poco porque el genoma del virus es segmentado (Shift antigénico); lo reportado en este análisis resulta bastante relevante ya que mutaciones en este sitio de unión podría afectar la especificidad de la unión a la membrana del hospedero pudiendo lograr pasar la barrera de especie y ser patógeno para otras especies en las que no se había reportado infección por algún subtipo específico de influenza. Para el caso del brote de H7N3 aquí evaluado se reportan las 3 mutaciones que afectan los dos loops y la hélice 190 del receptor (figura 7) (ver sección 6.4.2), pero no se reportan mutaciones de los residuos que interactúan con los enlaces de hidrógeno de las cadenas laterales del ácido siálico (Y106, W159, E199, Y204, H192).

En el artículo de Mair *et al* [13] se reportan una serie de mutaciones que podrían conferir transmisión entre hospederos mamíferos, en nuestros aislados se reportan las mutaciones G186V (G195V numeración en los aislados presentados en este estudio) y K193R (K202R numeración en los aislados presentados en este estudio), adicional a esto, las mutaciones N186K, K193R (K202R), Q196R y S227N, ya sea juntas o en combinación con otros cambios, se han visto asociadas a la reducción de la unión a α -2,3 pero contribuye al incremento del reconocimiento de SA α -2,6 en los subtipos H7 y H9, aún se desconoce cuáles otras variaciones de las 10 cepas del brote podrían verse involucradas en este cambio de preferencia de enlace en el sitio de unión al receptor.

Mutaciones en Neuraminidasa (figuras 8 y 9) se observa que el patrón de las mutaciones más frecuentes está para una cara del tetrámero, también es consistente ya que es la cara expuesta que está en la superficie viral, además, en la figura 9 se observa que aumenta notoriamente el número de sitios variables, las mutaciones que se reportan en la tabla 17 registran ese aumento de variabilidad al compararse con la referencia de la vacuna. Esta proteína es blanco de medicamentos como oseltamivir y zanamivir que se emplean como medicamentos para tratar este virus. Para este caso no se hay evidencia de que se tengan mutaciones puntuales que confieran resistencia a oseltamivir, pero hay residuos que poseen cierta relevancia, N344 está implicado con un incremento en la actividad de NA que puede compensar la pérdida de la mutación que confiere resistencia (H274Y), el residuo W295 permite un mayor rango de movimiento para Y275 y E276, la rotación de estos residuos es necesaria para crear bolsillo hidrofóbico donde se inserta pentil éter de oseltamivir, neuraminidasa del subtipo 3 podría desarrollar resistencia a oseltamivir ya que posee el residuo Y252 (Y256 numeración en aislados presentados en este estudio) que usualmente se encuentra en las neuraminidasas que desarrollan resistencia a este fármaco.

En los loops que reporta Qing, *et al*. [46] se identifican las siguientes características. En la figura 10 (Loop 270), su conformación está implicada a una posible resistencia a oseltamivir, debido a que la rotación de los residuos E276 (E278) y R224 (R225)

es crucial para la alta avidéz de la unión de este medicamento. El loop 380 (figura 11) está cerca del sitio de unión de calcio y varios sitios de unión de anticuerpos, este tipo de conformación es única para el subtipo N3 y podría tener algunas implicaciones funcionales, finalmente, el loop 430 (figura 12) puede generar la formación o pérdida de cavidad de loop 150 que se encuentra en las neuraminidasas que poseen resistencia a oseltamivir [46]

El análisis filogenético elaborado únicamente con los 10 aislados de interés, muestra la presencia de 3 grupos (ver sección 6.5), el grupo A conformado por: Aislado 01 (16_01), aislado 05 (16_05), aislado 09 (16_09) y aislado 10 (16_10), grupo B: Aislado 02 (16_02), aislado 03 (16_03), aislado 04 (16_04), aislado 08 (16_08) y finalmente, un grupo C: Aislado 06 (16_06), aislado 07 (16_07), bajo la ejecución de las topologías mediante los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (figura 13 y 14 respectivamente), se obtienen las mismas relaciones filogenéticas.

El set de datos empleado para generar las filogenias con genomas del Genbank para la cepa H7N3 con otros 126 genomas tomados del genbank (ver tabla 19), evidencia que hay un sesgo con respecto a norteamérica porque es la región que más secuencias presenta, esto puede ser a causa de que es donde más secuencias se reportan. La filogenias también se generaron por el método de inferencia bayesiana (figura 15) y máxima verosimilitud (figura 16), para ambas topologias el grupo de interés (resaltado en amarillo) evidencio las mismas relaciones filogenéticas con buenos valores de probabilidad y de soporte (figura 17), los genomas, los genomas A/chicken/Jalisco/CPA-04173-16-CENASA-95294/2016(H7N3), A/chicken/Puebla/CPA-04760-16-CENASA-95294/2016(H7N3) y A/chicken/Jalisco/CPA-01861-16-CENASA-95294/2016(H7N3) ingresaron al grupo 1 para relacionarse con los aislados pertenecientes al mismo. Los genomas que están como grupo más cercano al de nuestro interés son A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3), A/ruddy turnstone/NJ/AI12-2981/2012(H7N3), A/ruddy turnstone/New Jersey/AI11-

2098/2011(H7N3),A/northern shoveler/Illinois/12OS4951/2012(H7N3) y A/mallard/Maryland/12OS3630/2013(H7N3), de los cuales el primero es el genoma del aislado del granjero infectado con H7N3 durante el brote [50], y los últimos cuatro son de origen de Estados Unidos, lo que resulta bastante apropiado decir que el brote presentado en México 2012 de H7N3 pueda estar muy correlacionado con estos genomas.

Cabe resaltar, que las filogenias se elaboraron con los segmentos HA, NP, NA y MP, debido a que los segmentos que corresponden al grupo de las polimerasas (PB1, PB2 y PA) presentaron baja calidad y cobertura al momento de secuenciación, cuando se elaboraron los árboles de genes, los segmentos de polimerasas y NS presentaban altas incongruencias con topologías con bajos valores de soporte. Se decide realizar las filogenias con estos 4 segmentos debido a que se genera una topología confiable con buenos valores de soporte que evidencian de una mejor manera las relaciones filogenéticas entre los genomas utilizados.

El mapa de similitud de secuencia (Sección 6.6) muestra la formación de 3 clúster donde se agrupan las secuencias de H7N3 (figura 18), corresponden a América del sur, América del norte y Eurasia. En la figura 19, se señala con flechas negras los segmentos de hemaglutinina que están cercanamente relacionados a los segmentos de hemaglutinina de los genomas presentados en este estudio, con flechas naranja se muestran los segmentos de los genomas que están asociados,A/chicken/Guanajuato/CPA-02921-16-CENASA-95294/2016, A/Canada/rv504/2004, A/GSC_chicken/British Columbia/04 fueron los que estaban en el mapa con mayor cercanía. El primero es congruente su similitud debido a que se encuentran en el mismo país, y los dos últimos corresponden a virus aislados de humanos y son los que están más cercanos al caso de A/Mexico/InDRE7218/2012(H7N3).

En el apartado que corresponde a la N-glicosilación (sección 6.7) se observa que existen 7 sitios putativos de N-glicosilación (ver tabla 23) de los cuales se generan 3 nuevos sitios que no están en la referencia de JX397993, particularmente los aislados del grupo A (A01, A05, A09 y A10) cuentan con la sustitución P184S que genera un sitio para N-glicosilación en la posición N182. Esto resulta bastante importante ya que, al generarse estos nuevos sitios es una evidencia de que el virus está generando mecanismos de adaptación para escapar de la neutralización mediada por anticuerpos, debido a que la N-glicosilación puede alterar la superficie de la molécula y a su vez las interacciones electrostáticas con el anticuerpo, evitando que la partícula viral sea neutralizada. La glicosilación de la asparagina 141 (N141) ocurre por la mutación A143T en la hemaglutinina, esta mutación que genera este nuevo sitio de glicosilación y se va visto asociado con la falta de sensibilidad del virus para ser neutralizado por anticuerpos monoclonales murinos en el sitio antigénico A. La mutación A143T se ha asociado a aumentar la replicación viral, y con esto aumentar su infectividad [63]

La distribución de estos sitios (Figura 20) se encuentra predominantemente en el dominio globular, coincidiendo que es la región expuesta que interactúa con los anticuerpos de neutralización.

Esta información se puede correlacionar con el tipo de selección a la cual está sometida la hemaglutinina (tablas 24 y 25), para el caso de la selección al compararse con el genoma de referencia, solo se evidencia que existe selección positiva (>1) para el dominio globular de los aislados del grupo A y el aislado 02 del grupo B, se asocia a que estos generaron un sitio adicional de N-glicosilación; para el caso en comparación al genoma de referencia de la vacuna se observa que para todos los aislados en su dominio globular de hemaglutinina presentan selección positiva, se puede inferir que esto se debe a que existe un tiempo considerable entre el aislado de la vacuna (año 2006) y el de los aislados del estudio (año 2012), esto permite generación de nuevas mutaciones y mecanismos del virus que difieren con

la cepa de comparación generando que cada vez más sean más distantes genéticamente.

8. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, se puede concluir que evidentemente las cepas empleadas en este estudio poseen varias características a nivel de secuencia, que le pueden conferir algún tipo de escape del sistema inmune del hospedero, que para este caso son aves de corral, es por ello que la proteína de hemaglutinina y neuraminidasa presentan mutaciones que van dirigidas a un escape de los anticuerpos neutralizantes. Los segmentos de los 10 aislados presentan reorganización con otras cepas de México lo cual proporciona evidencia de un alto shift antigénico.

Las mutaciones en hemaglutinina se presentaron en su mayoría en el dominio globular, lo cual resulta consistente con la selección positiva que refleja este dominio. Para estos 10 genomas, la neuraminidasa no presentó evidencia a nivel de mutaciones que se asocien a una resistencia a oseltamivir, según lo reportado en literatura.

Existe una extensa diversificación genética de la cepa vacunal con respecto a los genomas presentados en este estudio, esto hace que se presente una distancia antigénica que permita considerar el diseño de una nueva vacuna para el control de próximos brotes con este subtipo de influenza aviar que pueda hacer frente a una buena inmunización.

No se presentaron mutaciones que confieren el potencial de transmisión vía aerosol de pollos a humanos, es necesario un análisis a nivel experimental para examinar la transmisión de este virus sin necesidad de las mutaciones que permiten transmisión vía aérea.

Las cepas que circulan en México se han diversificado en dos grupos filogenéticamente cercanos, esta cercanía puede repercutir en eventos de recombinación que generen brotes que circulen por tiempos más prolongados

generando mayores costos de tratamiento. Mediante las filogenias obtenidas se observa que el grupo más cercano a los diez genomas del brote de México son en su mayoría de origen estadounidense, posiblemente el brote vino de los Estados Unidos por importaciones de productos de origen avícola como el huevo hacia México.

9. REFERENCIAS

1. FAO. (2012). Highly Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3) - A significant threat to poultry production not to be underestimated. EMPRES WATCH, Vol. 26- August 2012. Rome.
2. OIE. Terrestrial Code. Chapter 10.4.1 Avian Influenza. General provision
1.a. http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.10.4.htm#chapitre_1.10.4.
3. Wild bird highly pathogenic avian influenza surveillance - Sample collection from healthy, sick and dead birds. FAO Animal Production and Health Manual, No. 4 (available at <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0960e/a0960e00.pdf>)
4. Lopez-Martinez I, Balish A, Barrera-Badillo G, Jones J, Nunez-Garcia TE, et al. (2013) Highly pathogenic avian influenza A(H7N3) virus in poultry workers, Mexico, 2012. *Emerg Infect Dis* 19: 1531–1534.
5. Cox, N., Subbarao, K. (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu.Rev. Med.* 51:407–421
6. Lambkin, R and Dimmock, N. (1996). Longitudinal study of an epitope-biased serum haemagglutination-inhibition antibody response in rabbits immunized with type A influenza virions. *Vaccine* 14:212–218
7. Hirst, M., Astell, C., Griffith, M., Coughlin, S., Moksa, M., Zeng, T., Smailus, D., Holt, R., Jones, S., Marra, A., Petric, M., Kraiden, M., Lawrence, D., Mak, A., Chow, R., Skowronski, D., Tweed, S., Goh, S., Brunham, R., Robinson, J., Bowes, V.,

- Sojonky, K., Byrne, S., Li, Y., Kobasa, D., Booth, T., Paetzel, M. (2004). Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect. Dis.* 10:2192–2195.
8. Max, V., Herrera, J., Moreira, R., Rojas, H. (2007). Avian influenza in Chile: a successful experience. *Avian Dis.* 51:363–365.
9. Berhane, Y., Hisanaga, T., Kehler, H., Neufeld, J., Manning, L., Argue, C., Handel, K., Hooper-McGrevy, K., Jonas, M., Robinson, J., Webster, R., Pasick J. (2009). Highly pathogenic avian influenza virus A (H7N3) in domestic poultry, Saskatchewan, Canada, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1492–1495.
10. OIE. (2012). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). OIE, Paris, France. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2012>.
11. Shtyrya, Y., Mochalova, L., Bovin, N. (2009). Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. *Acta Naturade*, 1(2), 26-32.
12. David A. Steinhauer, John J. Skehel. GENETICS OF INFLUENZA VIRUSES. 2002. *Annu. Rev. Genet.* 2002. 36:305–32
13. Mair, C., Ludwig, K., Herrmann, A., Sieben, C. (2014). Receptor binding and pH stability How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838, 1153-1168.
14. Bizebard T, Barbey-Martin C, Fleury D, Gigant B, Barrere B, et al. (2001). Structural studies on viral escape from antibody neutralization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 260:55–64
15. Von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, et al. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363:418–23

16. McKimm-Breschkin JL. (2000). Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors—a review. *Antiviral Res.* 47:1– 17
17. Ito T, Kawaoka Y. Host range barrier of influenza A viruses. (2000). *Vet Microbiol.*74:71-75.
18. Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, et al. (2000). Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J. Virol.* 74:6015–20
19. Orlich M, Gottwald H, Rott R. (1994). Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus. *Virology* 204:462–65
20. Rohde W, Scholtissek C. (1980). On the origin of the gene coding for an influenza A virus nucleocapsid protein. *Arch. Virol.* 64:213–23
21. Bergmann M, Garcia-Sastre A, Palese P. (1992). Transfection-mediated recombination of influenza A virus. *J. Virol.* 66: 7576–80
22. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. (2001). Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 “Spanish flu.” *Science* 293:1842–45
23. Hilleman MR. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine.*20:3068-3087
24. Webster RG, Bean WJ, Goren OT, Chambers TM, Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* ;56:53-179.

25. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ Xu KM *et al.* (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5NI influenza virus in eastern Asia. *Nature*;430:209-213.
26. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. (1989). Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A virus in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 63:4603–8
27. Scholtissek C, von Hoyningen V, Rott R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87:13–20
28. Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC, Bean WJ. (1981). Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect. Immunol.* 34:354–61
29. Kida HIT, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, *et al.* (1994). Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J. Gen. Virol.* 75:2183–88
30. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, *et al.* (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 72:7367–73
31. Smith FL, Palese P. (1989). Variation in influenza virus genes: epidemiology, pathogenic, and evolutionary consequences. In *The Influenza Viruses*, ed. RM Krug, pp. 319–59. New York: Plenum
32. 84. Alexander DJ. Highly pathogenic avian influenza. En: *OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 4a. edición. París: OIE, 2004:212-220
33. Perroncito E. Epizootia tifoide nei gallinacei. *Annali Accademia Agriculture Torino* 1878;21:87-126.

34. García-García, Juan, & Ramos, Celso. (2006). La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Pública de México*, 48(3), 244-267. Recuperado en 02 de mayo de 2017, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000300009&lng=es&tlng=pt.
35. Clustal W and Clustal X version 2.0. (2007 November 01) *Bioinformatics* (Oxford, England) 23 (21) :2947-8
36. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information *Nucleic Acids Research* 2014 (1 July 2014) 42 (W1): W252-W258
37. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
38. A. Stamatakis: "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". In *Bioinformatics*, 2014,
39. Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. (2011). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* in press
40. Franco-Sierra ND, Gómez-Zuluaga M, Díaz-Nieto JF and Alvarez JC. PhyPipe: an automated pipeline for phylogenetic reconstruction from multilocus sequences [version 1; not peer reviewed]. *F1000Research* (2016), 5(ISCB Comm J):1609 (poster) (doi: [10.7490/f1000research.1112509.1](https://doi.org/10.7490/f1000research.1112509.1))

41. Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S. C., Ozawa, M., Shinya, K., ... Kawaoka, Y. (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 haemagglutinin (HA) confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 486(7403), 420–428. <http://doi.org/10.1038/nature10831>
42. Herfst, S., Schrauwen, E. J. A., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V. J., ... Fouchier, R. A. M. (2012). Airborne Transmission of Influenza A/H5N1 Virus Between Ferrets. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6088), 1534–1541. <http://doi.org/10.1126/science.1213362>
43. Russell, C. A., Fonville, J. M., Brown, A. E. X., Burke, D. F., Smith, D. L., James, S. L., ... Smith, D. J. (2012). The potential for respiratory droplet transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6088), 1541–1547. <http://doi.org/10.1126/science.1222526>
44. Yang, H., Chen, L.-M., Carney, P. J., Donis, R. O., & Stevens, J. (2010). Structures of Receptor Complexes of a North American H7N2 Influenza Hemagglutinin with a Loop Deletion in the Receptor Binding Site. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001081. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001081>
45. Lin, Y. P., Xiong, X., Wharton, S. A., Martin, S. R., Coombs, P. J., Vachieri, S. G., McCauley, J. W. (2012). Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52), 21474–21479. <http://doi.org/10.1073/pnas.1218841110>
46. Li, Q., Qi, J., Wu, Y., Klyota, H., Tanaka, K., Suhara Y., Ohrui, H., Suzuki, Y., Vavricka, C., Gao, G. (2013). Functional and Structural Analysis of Influenza Virus

Neuraminidase N3 Offers Further Insight into the Mechanisms of Oseltamivir Resistance. *Journal of Virology*, 87, 18.

47. Liechti, R., Gleizes, A., Kuznetsov, D., Bougueleret, L., Le Mercier, P., Bairoch, A., & Xenarios, I. (2010). OpenFluDB, a database for human and animal influenza virus. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2010, baq004. <http://doi.org/10.1093/database/baq004>

48. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *R. Gupta, E. Jung and S. Brunak*. In preparation, 2004.

49. Korber B. (2000). HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences*, Chapter 4, pages 55-72. Allen G. Rodrigo and Gerald H. Learn, eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

50. Lopez-Martinez I, Balish A, Barrera-Badillo G, Jones J, Nunez-Garcia TE, et al. (2013) Highly pathogenic avian influenza A(H7N3) virus in poultry workers, Mexico, 2012. *Emerg Infect Dis* 19: 1531–1534.

51. Erica Spackman, Xiu-Feng Wan, Darrell Kapczynski, Yifei Xu, Mary Pantin-Jackwood, David L. Suarez, and David Swayne Potency. (2014). Efficacy, and Antigenic Mapping of H7 Avian Influenza Virus Vaccines Against the 2012 H7N3 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from Mexico. *Avian Diseases* 58 (3), 359-366.

52. CDC. Isolation of avian influenza A (H5N1) viruses from humans; Hong Kong, May-December 1997. *MMWR* 1997;46:1204-1207.

53. Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W *et al.* (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with fatal respiratory illness. *Science*. 279:393-396.
54. Claas EC, Osterhaus AD, Van Beek R, De Jong JC; Rimeelzwaan GF, *et al.* (1998) Human influenza A H5N1 virus related to highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*. 351:472-477.
55. Suarez DL, Perdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C *et al.* (1998). Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J Virol* 72:6678-6688.
56. Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC *et al.* (2002). Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8950-8955.
57. World Health Organization Epidemia and pandemic alert and response (EPR) Avian Influenza. Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html
58. World Organization for Animal Health (OIE). Update on avian influenza in animals (type H5). Disponible en: http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm
59. Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N *et al.* (2005) Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan. *Virology* 5:167-176.

60. Organización mundial de la salud. Infección humana por virus de la gripe aviar A(H7N9) – China.(2017). Recuperado de <http://www.who.int/csr/don/20-april-2017-ah7n9-china/es/>

61. Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, et al. (2012) Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 336:1534-41.

62. Imai M, Watanabe T, Hatta M, et al. (2012) Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486:420-8.

63. Alvarado-Facundo, E., Vassell, R., Schmeisser, F., Weir, J. P., Weiss, C. D., & Wang, W. (2016). Glycosylation of Residue 141 of Subtype H7 Influenza A Hemagglutinin (HA) Affects HA-Pseudovirus Infectivity and Sensitivity to Site A Neutralizing Antibodies. *PLoS ONE*, 11(2), e0149149. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0149149>

64. Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996).Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.* 266:131-141.

65. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M. and Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*25 (9) 1189-1191 doi: 10.1093/bioinformatics/btp033