

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“IDENTIFICACIÓN DE TIPOS Y SUBTIPOS DEL VIRUS DE
INFLUENZA Y SU CO-INFECCIÓN CON PATÓGENOS
ASOCIADOS A ENFERMEDADES RESPIRATORIAS MEDIANTE
RE-SECUENCIACIÓN CON MICROARREGLOS”**

Presenta:

Q.F.B. Carlos Antonio Willis Rodríguez

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN
CIENCIAS con Acentuación en Microbiología

Abril del 2013

**“IDENTIFICACIÓN DE TIPOS Y SUBTIPOS DEL VIRUS DE
INFLUENZA Y SU CO-INFECCIÓN CON PATÓGENOS
ASOCIADOS A ENFERMEDADES RESPIRATORIAS MEDIANTE
RE-SECUENCIACIÓN CON MICROARREGLOS”**

Comité de Tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez
Directora de la Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretaria

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dra. Lydia Rivera Morales
Vocal

Dr. Mario Bermúdez de León
Vocal

Asesor Externo:

Dr. Floyd P. Horn

**“IDENTIFICACIÓN DE TIPOS Y SUBTIPOS DEL VIRUS DE
INFLUENZA Y SU CO-INFECCIÓN CON PATÓGENOS
ASOCIADOS A ENFERMEDADES RESPIRATORIAS MEDIANTE
RE-SECUENCIACIÓN CON MICROARREGLOS”**

Presenta:

Q.F.B. Carlos Antonio Willis Rodríguez

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo del Departamento de Biología Celular y Genética y en el laboratorio de influenza ubicados en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

A mis padres

Este trabajo está dedicado a ustedes, por todos sus esfuerzos, su cariño, su gran ejemplo y por todo el amor que me han brindado.

Muchas gracias por todo el apoyo, su paciencia, sus regaños, consejos y su gran labor como padres.

A mis hermanas

Tetey y Ana Cecy muchas gracias por el cariño, el afecto y los consejos que me han brindado siempre. Gracias por ser un ejemplo en esta vida.

A mis abuelos

Por ese gran ejemplo que siempre me han dado pero sobre todo por el infinito amor que tienen con sus hijos y con sus nietos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Reséndez Pérez

Un agradecimiento muy especial por permitirme ser parte de este proyecto y por dejarme ser parte de su laboratorio. Muchas gracias por la excelente dirección de este trabajo, por todos sus consejos, enseñanzas pero sobre todo por el gran ejemplo que representa su carrera científica para todos.

Al M.C. Santiago Saavedra Alonso

Por todo su apoyo y enseñanzas durante la realización de este trabajo. Muchas gracias Chago por siempre querer ayudar y por tu amistad brindada.

A la M.C. Delia Reyna y al L.B.G. Ángel Fraga

Por haber sido los primeros maestros que me capacitaron en el laboratorio. Gracias por su paciencia y consejos.

A mi comité de tesis

Por la asesoría brindada durante el desarrollo y la revisión de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT proyecto SALUD-2009-02-127033) por el apoyo al proyecto y por la beca otorgada para la realización de la maestría.

A Nancy Villarreal

Por todo el apoyo brindado con los tramites, registro y papeleos. Muchas gracias por tu amistad y por esos consejos que me diste a lo largo de estos dos años.

A todos los integrantes que componen la Unidad de Biología del Desarrollo

Por todo su apoyo brindado, por sus consejos en los seminarios internos, por su amistad, compañerismo, unión y compañía.

A Luis Sixtos y Brenda Xoconostle

Por su gran apoyo al proyecto de Influenza.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. NOMENCLATURA	9
2. LISTA DE TABLAS	12
3. LISTA DE FIGURAS	14
4. RESÚMEN Y ABSTRACT	15
5. INTRODUCCIÓN	17
6. ANTECEDENTES	19
6.1 Infecciones respiratorias agudas	19
6.2 Virus de influenza	19
6.3 Estructura del virus	20
6.4 Estructura del genoma	21
6.5 Ciclo de replicación del virus	22
6.5.1 Adsorción viral	23
6.5.2 Entrada del virus	24
6.5.3 Síntesis de RNA viral	24
6.5.4 Síntesis de proteínas virales	25
6.5.5 Morfogénesis del virus	25
6.5.6 Salida de la progenie viral	25
6.6 Generación de nuevos virus	25
6.6.1 Variación genética	26
6.6.2 Variación antigénica	26
6.7 Especificidad del hospedero y salto inter-especie	26
6.8 Influenza pandémica e influenza estacional	27
6.9 Pandemias de influenza A	28
6.10 Pandemia de influenza AH1N1 en el 2009	29
6.11 Co-infección del virus de influenza con patógenos asociados a enfermedades respiratorias	29
6.12 Vigilancia epidemiológica y técnicas diagnósticas	30
6.13 Antecedentes de los microarreglos	31
6.14 Ventajas de los microarreglos	32
6.15 Microarreglo RPM-Flu 3.1	33
6.15.1 Análisis de la base de datos RPM-Flu	34
7. HIPÓTESIS	35
8. OBJETIVOS	35

8.1	Objetivo general	35
8.2	Objetivos particulares	35
9.	Estrategia Experimental	36
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
10.1	Colecta de muestras	37
10.2	Extracción de ácidos nucleicos totales	37
10.3	Cuantificación de los ácidos nucleicos totales	37
10.4	Síntesis de los DNAs complementarios al RNAm (DNAc)	38
10.5	Amplificación mediante Multiplex PCR	38
10.6	Purificación de las muestras de DNAc	39
10.7	Fragmentación y marcaje de la muestra de DNAc	40
10.8	Hibridación, lavado y escaneado de la muestra	41
10.9	Análisis e interpretación de resultados	42
10.10	Análisis con TSEQ	42
10.11	Análisis estadísticos	44
11.	RESULTADOS	45
11.1	Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1	45
11.2	Aislamiento de los ácidos nucleicos de las muestras de influenza de las muestras provenientes de los estados de Nuevo León y Oaxaca. México	48
11.3	Detección de diferentes tipos y subtipos del virus de la influenza	49
11.4	Detección de la infección y/o co-infección con patógenos asociados a influenza	59
12.	DISCUSIÓN	76
13.	CONCLUSIONES	81
14.	LITERATURA CITADA	83
15.	APENDICE A	86

1. NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
cDNA	DNA complementario
cRNA	RNA complementario
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EB	Buffer de Elución
G	Gramos
HA	Hemaglutinina
IRA	Infecciones Respiratorias Agudas
Mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimoles
ng	Nanogramos
nt	Nucleótido

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrogeno
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
M	Proteína de Matriz
mRNA	RNA mensajero
NA	Neuraminidasa
NANA	Acido Siálico
NEP	Proteína de Exportación Nuclear
NP	Nucleoproteína
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Buffer de Unión
PE	Buffer de lavado
RNP	Ribonucleoproteína
qPCR	PCR tiempo real
SSA	Secretaria de Salud
TdT	Transferasa de Desoxinucleótidos Terminales

UDG

Uracilo-DNA Glicosilasa

vRNA

RNA viral

2. LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Preparación de la mezcla de transcripción reversa	38
II. Preparación de la mezcla maestra Multiplex PCR	38
III. Preparación de la mezcla de fragmentación maestra	40
IV. Preparación de la mezcla de marcaje	40
V. Preparación de la mezcla de hibridación maestra	41
VIa. Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1 utilizando la vacuna FLUZONE®	45
VIb. Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1 utilizando la vacuna FLUARIX®	46
VIc. Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1 utilizando controles positivos	47
VII. Casos positivos de influenza AH1N1 pandémica por PCR tiempo real	48
VIII. Concentración y calidad de los ácidos nucleicos totales	49
IXa. Muestras positivas de Influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1	50
IXb. Muestras positivas de Influenza AH3N2 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1	57
IXc. Muestras positivas de Influenza B estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1	58
IXd. Muestras positivas de Influenza AH1N1 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1	58
Xa. Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1	59
Xb. Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza AH1N1	

estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1	69
Xc. Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza AH3N2 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1	69
Xd. Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza B con el microarreglo RPM-Flu 3.1	70
XI. Total de patógenos asociados a enfermedades respiratorias confirmados con el microarreglo RPM-Flu 3.1 en los estados de Nuevo León y Oaxaca, México	71
XII. Asociación entre los patógenos (bacterias y virus) encontrados con Influenza AH1N1 pandémica	72
XIII. Distribución de los patógenos positivos con el microarreglo RPM-Flu 3.1 en los casos positivos y negativos de Influenza AH1N1 pandémica por qPCR	74

3. LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura del virus de Influenza	21
2. Ciclo de replicación del virus de Influenza A	22
3. Lista de patógenos detectados con el microarreglo RPM-Flu 3.1	34
4. Estrategia Experimental	36
5. Ventana ampliada de los resultados obtenidos en el reporte de TessArae	43

4. RESÚMEN

El virus de la influenza A sufre constantes mutaciones que introducen nuevas variables génicas capaces de provocar brotes epidémicos o pandemias ocasionando un problema de salud pública. La vigilancia del virus de la influenza es fundamental para la mejora del manejo de la enfermedad y es especialmente importante para la detección temprana que permita identificar rápidamente la propagación de brotes, detección de nuevas variantes del virus de la influenza, o emergencia de nuevos patrones de resistencia.

Debido a lo anterior, el objetivo de esta tesis es determinar la presencia de diferentes tipos y subtipos del virus de la influenza AH1N1 así como co-infecciones con patógenos asociados a enfermedades respiratorias para contribuir a la vigilancia sobre epidemiología molecular del virus influenza AH1N1 en la República Mexicana. Para ello, en esta investigación se detectaron e identificaron de forma simultánea y efectiva los diferentes tipos y subtipos de influenza así como su co-infección con otros patógenos asociados a enfermedades respiratorias en muestras provenientes de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México, usando el ensayo de microarreglos basado en la re-secuenciación (RMP-Flu-3.1). La metodología consistió en la extracción de los ácidos nucleicos totales de las muestras colectadas y la transcripción inversa para convertir los RNAs virales a DNAs. Posteriormente, los DNAs, se amplificaron por medio de PCR multiplex, se fragmentaron, se marcaron con biotina y se hibridaron en el microarreglo RPM-Flu 3.1, el cual fue lavado, fijado y escaneado para el análisis de las secuencias nucleotídicas identificadas. Los resultados de las secuencias nucleotídicas obtenidas con el microarreglo RPM-Flu 3.1 detectaron 70 muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica, dos para influenza AH1N1 estacional, tres para influenza AH3N2 estacional y tres para influenza B, siendo el subtipo de influenza AH1N1 pandémica el mayormente identificado tanto en las poblaciones de Nuevo León como en Oaxaca, México. Así mismo, se determinó la infección simultánea de patógenos asociados a enfermedades respiratorias con el virus de influenza AH1N1 pandémica identificando a las bacterias del género *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* y *Moraxella* y a los virus *Rinovirus*, *Coronavirus* y *Coxsackie* siendo el estado de Oaxaca, México el que presentó en las muestras una mayor proporción de co-infección. Los géneros bacterianos que presentaron mayor asociación con el virus de influenza AH1N1 pandémica fueron *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* y *Neisseria*. Se encontró una correlación positiva entre el virus de influenza AH1N1 pandémica y la bacteria *Neisseria meningitidis* y correlación negativa entre el virus de influenza AH1N1 pandémica y *Moraxella*, *Rinovirus* y *Parainfluenza*.

Los resultados obtenidos en esta investigación abren la posibilidad de detectar la aparición de nuevos re-arreglos específicos al gen de matriz, neuraminidasa y hemaglutinina del virus de influenza AH1N1 pandémica en pacientes de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México. También permitirán determinar los patógenos asociados a los virus de influenza B, AH3N2 estacional y AH1N1 estacional en un mayor número de casos.

ABSTRACT

Influenza A virus suffers constant mutations that introduce new genetic variants that can cause epidemic outbreaks or pandemics causing a public health problem. Surveillance of influenza A virus is essential for improving the management of the disease and is especially important for early detection to quickly identify outbreaks, detection of new variants of influenza virus, or emergence of new patterns of resistance.

The objective of this thesis is to determine the presence of different types and subtypes of influenza virus and co-infections with pathogens associated with respiratory diseases to help monitor the molecular epidemiology of the influenza virus in Mexico. In this investigation, we detected and identified simultaneously and effectively the different types and subtypes of influenza virus and its co-infections with other pathogens associated with respiratory diseases in samples from the states of Nuevo Leon and Oaxaca, Mexico, using a microarray assay based on re-sequencing (RMP-Flu 3.1). The methodology included the extraction of total nucleic acids of the collected samples and reverse transcription to convert the viral RNAs to cDNA. Subsequently, the cDNA were amplified by multiplex PCR, fragmented, labeled with biotin and hybridized to the microarray RPM-Flu 3.1, which was washed, fixed and scanned for the analysis of the nucleotide sequences. The results of the nucleotide sequences obtained with the microarray RPM-Flu 3.1 detected 70 positive samples for influenza AH1N1 pandemic, two for seasonal influenza AH1N1, three for seasonal influenza AH3N2, and three for influenza B being influenza AH1N1 pandemic the most identified subtype in Nuevo Leon and Oaxaca, Mexico. Furthermore, we investigated the simultaneous infection of pathogens associated with respiratory diseases with influenza AH1N1 pandemic identifying bacteria of the genre *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Rhinovirus*, *Coronavirus*, and *Coxsackie virus* being the state of Oaxaca, Mexico which presented a higher proportion of co-infections in the samples. Bacteria genre that presented greater association with influenza AH1N1 pandemic virus were *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, and *Neisseria*. We found a positive correlation between influenza AH1N1 pandemic virus and the bacteria *Neisseria meningitidis* and negative correlations between influenza AH1N1 pandemic virus and *Moraxella*, *Rhinovirus*, and *Parainfluenza*.

Results obtained in this thesis open the possibility to detect new arrangements specific to the matrix, neuraminidase, and hemagglutinin gene of influenza AH1N1 pandemic virus in patients from the states of Nuevo Leon and Oaxaca, Mexico and the possibility to determine pathogens associated with Influenza B, seasonal AH1N1, and seasonal AH3N2 in a larger number of cases.

5. INTRODUCCIÓN

La influenza epidémica es responsable de morbilidad y mortalidad significativa y tiene un serio impacto social y económico en todo el mundo (WHO, 2005). Cada año el virus de la influenza tipo A causa de 3 a 5 millones de infecciones graves en humanos, y 0.25 a 0.5 millones de personas mueren por gripe en todo el mundo (OMS EB111/10). El virus de la gripe evade la inmunidad del huésped debido a la acumulación de mutaciones puntuales (de deriva) en la superficie de las principales glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), o por redistribución de los segmentos de diferentes virus que co-infectan la misma célula, y que conducen a una cepa nueva con HA y NA que no se mostraban en la población anteriormente. Este proceso es llamado salto génico y puede ser el resultado de un evento de re asociación del virus influenza A humano y aviar (o humano/aviar/porcino).

La influenza es una enfermedad altamente contagiosa que sufre una serie de mutaciones puntuales conocidas como deriva genética o intercambio de segmentos génicos con otros tipos de virus de influenza de diferentes hospederos naturales, tales como las aves y cerdos. Estos cambios suceden principalmente en las proteínas de hemaglutinina y neuraminidasa, y traen como consecuencia la aparición de nuevos subtipos virales. Las mutaciones antigénicas emergen y son seleccionadas como “el virus predominante” que son diferentes del virus antecedente, el cual es un virus nuevo para el resto de la población y en algunos casos da origen a nuevas pandemias.

Al menos cuatro pandemias de influenza ocurrieron en el siglo XIX y tres en el siglo XX. La pandemia de "influenza española" en 1918-1919 causó un número estimado de 21 millones de muertes alrededor del mundo. Esta pandemia permitió la introducción de la influenza A subtipo H1N1. Otras pandemias fueron las provocadas por gripe asiática en 1957 (H2N2) y la gripe de Hong Kong en 1968 (H3N2). Se cree que estos virus surgieron a través de interacciones del virus humano con otras cepas presentes en las aves que actúan como reservorios, o por introducción directa de la cepa aviar en la población humana, que se sugiere para la pandemia de 1918 (Adam *et al.*, 2009). En la actualidad sólo dos de los 16 posibles Subtipos de HA (H1 y H3), y dos de los nueve posibles Subtipos de NA (N1 y N2) circulan en la población humana (Bragstad, 2008).

Los brotes de influenza son verdaderos problemas de salud pública con un alto índice de mortalidad, además que provocan grandes pérdidas a la economía y desquicia la vida social. En nuestro país, la Secretaria de Salud reportó durante la pandemia de influenza un total de 72,548 casos confirmados y 1,316 defunciones el 9 de Noviembre del 2009. Las entidades federativas más afectadas fueron el Distrito Federal con 6,765 casos,

Chiapas con 3,607 casos, Estado de México con 3,415 casos y Nuevo León con 3,383 casos. Debido a todos estos factores es importante establecer programas de vigilancia epidemiológica que permitan detectar los tipos y subtipos de virus de influenza circulantes así como los virus emergentes. Para que estos programas de vigilancia sean exitosos, se requiere implementar nuevas técnicas y herramientas de vanguardia que nos permitan un resultado inmediato para el manejo adecuado de la enfermedad.

6. ANTECEDENTES

6.1 Infecciones respiratorias agudas

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) son un variado grupo de enfermedades causadas por agentes que afectan diversas zonas de las vías respiratorias. Entre los signos y síntomas de las IRA están tos de menos de 15 días de duración, dificultad para respirar, estridor, dolor o enrojecimiento faríngeo, otalgia, otorrea, rinorrea, y obstrucción nasal. Entre las IRA se encuentran aquellas infecciones leves como resfriado o catarro, faringitis, amigdalitis, bronquitis, otitis, o enfermedades graves como la neumonía.

Las Infecciones Respiratorias Agudas son causadas tanto por agentes bacterianos como virales. Entre las bacterias que causan estas infecciones están *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus B hemoliticus*. Los agentes virales más comunes son el virus Sincitial Respiratorio (RSV), parainfluenza, influenza y coxsackie, entre otros. Las infecciones respiratorias por virus comúnmente desencadenan condiciones serias que pueden resultar en la hospitalización de aquellos pacientes que además padecen una condición crónica. Un estudio reciente reveló que de forma general, han incrementado las tasas de hospitalización y los ingresos por infecciones agudas del tracto respiratorio inferior desde 1980. (Sánchez Tarrago, 1996). Según este estudio el 93% de los pacientes mayores de 5 años hospitalizados tenían un estado subyacente crónico, comúnmente una enfermedad pulmonar crónica en la que la influenza, parainfluenza y RSV fueron los responsables del 75% de todas las infecciones por virus. La influenza epidémica es responsable de morbilidad y mortalidad significativa con un serio impacto social y económico a través del mundo (WHO, 2005). Cada año el virus de la influenza tipo A causa de tres a cinco millones infecciones graves en humanos y 0.25 a 0.5 millones de personas mueren por influenza en todo el mundo (WHO, 2005).

6.2 Virus de influenza

Los virus de influenza A, B y C representan tres de los cinco géneros de la familia Orthomyxoviridae, sus genomas son RNAs segmentados de cadena negativa. La secuenciación ha confirmado que estos virus comparten un ancestro genético común. Estos virus tienen una nomenclatura estándar que incluye: tipo de virus, especie de donde fue aislado, localización del lugar de aislamiento, número de aislado y año de aislamiento. Únicamente los virus de influenza A son caracterizados adicionalmente por el subtipo de sus glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Muchos subtipos genéticos distintos de influenza A han sido encontrados en

circulación (16 para HA y 9 para NA; Bouvier y Palese 2008). Cada uno de estos subtipos pueden ser aislados de aves acuáticas, sugiriendo que las especies aviares son los hospederos naturales de los virus influenza. De éstos virus solo los subtipos H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7 y H9N2 han sido aislados de humanos y solo los subtipos de tres HA (H1,H2 y H3) y de dos NA (N1 y N2) han causado epidemias en humanos (Cheung y Poon 2007). Los virus de influenza A, B y C pueden ser distinguidos en la base de sus diferencias antigénicas entre sus nucleoproteínas (NP) y proteínas de matriz (M). Ambos virus influenza A y B contienen 8 segmentos genómicos de RNA, mientras que el virus de influenza C contiene solo 7 segmentos genómicos de RNA. Todos estos virus pueden infectar naturalmente al hombre, sin embargo sólo el virus de la influenza A ha sido responsable de todas las pandemias (Bouvier y Palesse 2008; Suzuki 2005).

6.3 Estructura del virus

El virus de influenza A es un virus envuelto. La envoltura lipídica, derivada de la célula hospedera, contiene tres proteínas, la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa, y la proteína de canal iónico M2, tal como se observa en la figura 1. Las proteínas HA y NA son relativamente abundantes, mientras que la proteína M2 presenta pocas copias. Por debajo de la envoltura está la proteína de matriz M1, dentro de esta estructura se encuentran 8 complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) compuestas cada una de un segmento de RNA viral (RNA_v) asociado con la nucleoproteína viral (NP). El RNA_v exhibe una complementariedad inversa en sus extremos 3' y 5' por lo cual pueden formar una estructura parcialmente apareada. La polimerasa viral, que consiste de tres proteínas virales, PA, PB1 y PB2, está asociada a la estructura de la proteína de Matriz (M1). También están presentes en esta partícula pequeñas cantidades de la proteína de exportación nuclear NS2 o NEP (Basler, 2007).

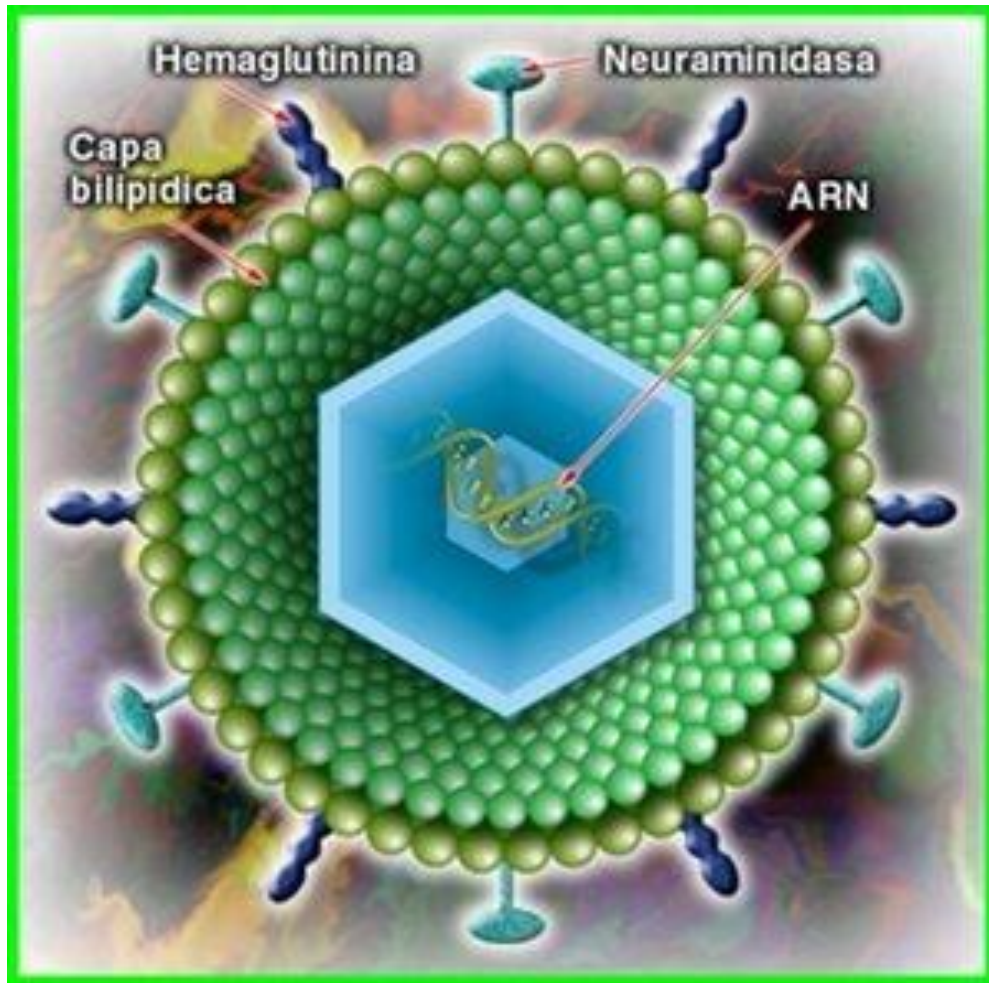


Figura 1. Estructura del virus de influenza. El virus de influenza contiene una bicapa lipídica y de 7 a 8 fragmentos de RNA viral. El genoma del tipo A codifica para las proteínas Hemaglutinina y Neuraminidasa. Tomada de Rivera García, 2009

6.4 Estructura del genoma

Los 8 segmentos de los virus influenza A y B (y los 7 segmentos del virus de influenza C) son numerados según su longitud, en orden decreciente. Los segmentos 1, 3, 4 y 5 de influenza A y B codifican una proteína por segmento: proteínas PB2, PA, HA, y NP, respectivamente. Todos los virus de la influenza codifican la subunidad PB1 de la polimerasa en el segmento 2. En algunas cepas de influenza A, este segmento también codifica para la proteína accesoria PB1-F2, una pequeña proteína de 87-aminoácidos con actividad pro-apoptótica.

El segmento 6 del virus de influenza A codifica sólo para la proteína NA, mientras que el mismo segmento en el virus de la influenza B codifica para NA y para la proteína de matriz NB. La proteína NB es una parte integral de membrana correspondiente a la proteína M2 de influenza A. El segmento 7 de los virus de influenza A y B codifica para

la proteína de matriz M1. En el genoma de influenza A, la proteína M2 es también expresada del segmento 7 por un “splicing” alternativo, mientras que para influenza B codifica su proteína de membrana BM2 en un marco de lectura alternativo.

Finalmente, para los virus A y B, el segmento 8 codifica para la proteína NS1 (antagonista de interferón) y por splicing del RNAm la NEP/NS2, la cual está involucrada en la exportación de las ribonucleoproteínas virales del núcleo de la célula hospedera. La organización genómica del virus de influenza C, con siete segmentos, es similar a la organización de los virus A y B, con la excepción que la proteína HEF reemplaza las proteínas HA y NA (Bouvier y Palesse, 2008).

Un genoma segmentado permite el cambio antigénico por re-asociación de segmentos de diferentes subtipos. Esta re-asociación de segmentos puede suceder en células infectadas con diferentes tipos de virus humanos y animales y el virus resultante podría codificar propiedades antigénicas completamente nuevas para las cuales la población humana no tendría inmunidad preexistente. Una pandemia de influenza surge cuando se genera un virus con cambio antigénico para el cual los humanos no tienen memoria inmunológica (Bouvier y Palesse, 2008).

6.5 Ciclo de replicación del virus influenza

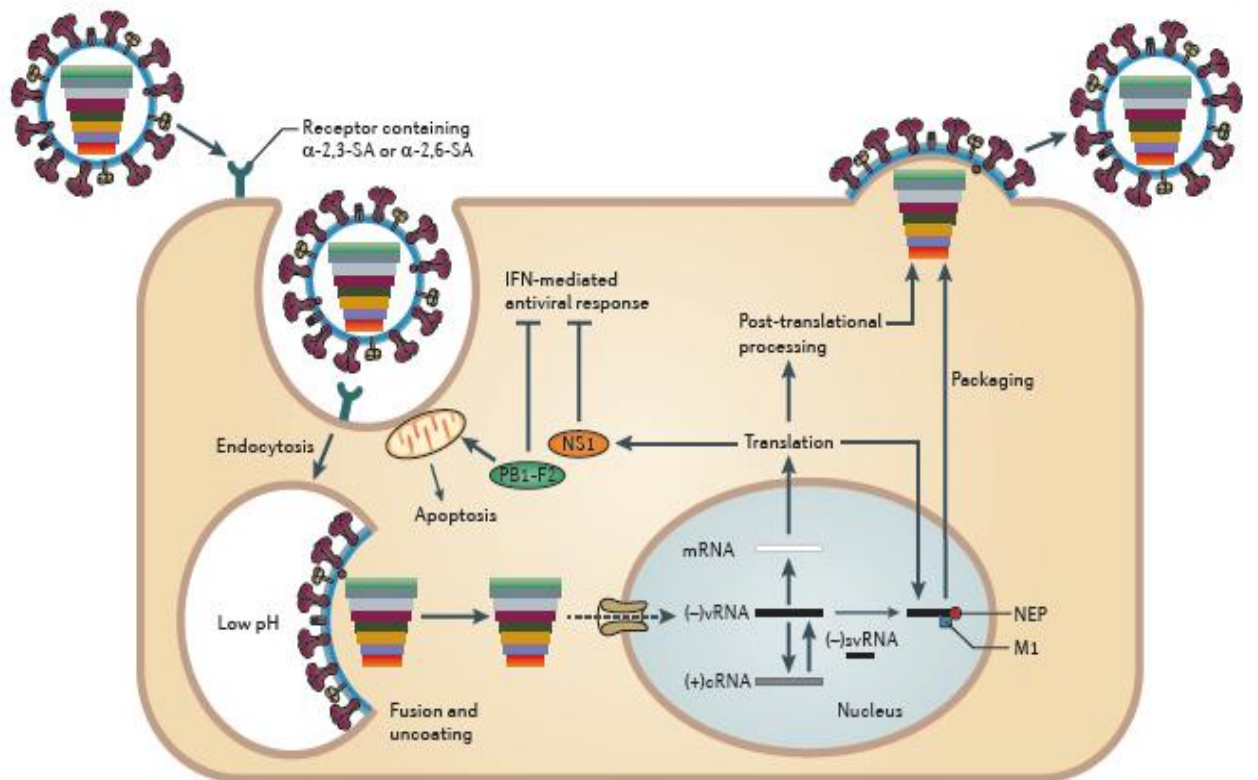


Figura 2. Ciclo de replicación del virus de influenza A. En la etapa inicial de la replicación del

virus de influenza A, la HA viral se une al ácido siálico en la superficie de la célula hospedera y el virus entra a la célula por medio de una endocitosis mediada por receptor. El pH ácido del endosoma abre los canales iónicos M2, resultando en una acidificación del interior del virus, un proceso que es necesario para la liberación de las ribonucleoproteínas (RNP) al citoplasma. Las RNP son translocadas al núcleo donde la polimerasa de RNA dependiente de RNA transcribe y replica el RNA viral de sentido negativo ((-)RNA_v) formando tres tipos de moléculas de RNA: RNA complementario de sentido positivo ((+)RNA_c), el cual utiliza como templado para sintetizar más RNA viral; RNA pequeño viral de sentido negativo (svRNAs) los cuales regulan el cambio de transcripción a replicación; y los RNAs, que son exportados al citoplasma para su transducción. Proteínas virales que son necesarias para la replicación y transcripción son translocadas al núcleo mientras que las proteínas estructurales (HA, NA y M2) son llevadas a la membrana celular. Las RNP son entonces exportadas al citoplasma y llevadas a la membrana celular con ayuda de la proteína M1 y NEP para el ensamblaje. La salida del virus de influenza A de la célula hospedera es mediada por la actividad sialidasa de la NA, que destruye el ácido siálico de las glicoproteínas celulares.

Tomada de Medina y Garcia-Sastre, 2011

6.5.1 Adsorción viral

Los virus influenza reconocen el ácido N-acetylneuramínico (siálico) en la superficie de la célula hospedera. Los ácidos siálicos son monosacáridos ácidos de nueve carbonos comúnmente encontrados en el extremo terminal de muchos glicoconjugados que son ubicuos en muchos tipos de células y en muchas especies animales. El carbón-2 terminal del ácido siálico puede unirse a el carbón-3 o el carbón-6 de galactosa, estas diferentes uniones resultan en configuraciones estéricas únicas del ácido siálico terminal. La fracción de ácido siálico es reconocida y unida por los “spikes” en la superficie de los virus influenza, los cuales tienen una especificidad preferencial para uniones -2,3- o uniones -2,6-. En las células epiteliales de tráquea de humanos las uniones -2,6- predominan; en el epitelio del intestino de patos son más comunes las uniones -2,3-. El ácido siálico con uniones terminales -2,3- está también presente en el epitelio respiratorio humano, pero en menor abundancia. Consecuentemente, los humanos y otros primates pueden ser infectados por virus de influenza aviar, aunque con menos eficiencia que con otras cepas humanas. La expresión diferencial de ácido siálico en el tracto respiratorio de los mamíferos puede explicar la baja infectividad y alta patogenicidad de algunas cepas de virus aviar. En humanos, las proteínas de ácido siálico con uniones -2,3- suelen ser menos abundantes y más prevalentes en tracto respiratorio bajo (bronquiolos y alveolos). Los pulmones no son accesibles a partículas virales transportadas por aire como es el tracto respiratorio alto (nasofaringe, senos paranasales, traquea, y bronquios). Por lo tanto, la infección con virus aviar es relativamente rara en humanos, sin embargo cuando una cepa aviar infecta el pulmón humano resulta en una neumonía severa con grados de fatalidad que exceden el 60%.

Durante la replicación viral, la proteína HA es cortada por serin-proteasas en HA1 y HA2; esta modificación post-traducciona es necesaria para la infectividad del virus. Se cree que la HA2 media la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular. La HA1 contiene el receptor y los sitios antigénicos variables. Las mutaciones en múltiples sitios antigénicos resultan en una cepa viral que no será efectivamente neutralizada por anticuerpos del hospedero, lo que lo hace susceptible a infecciones (White, 1990).

6.5.2 Entrada del virus

Una vez que de la proteína HA del virus influenza se une al ácido siálico el virus es endocitado. La acidificación del compartimento endosomal es crucial para que el virus pueda liberarse de su envoltura por dos caminos. Primero, el bajo pH conduce a un cambio conformacional en la HA, exponiendo un péptido de fusión que media la fusión de la envoltura con la membrana endosomal, de esta manera abre un poro a través del cual las RNPs son liberadas en el citoplasma celular. Segundo, los iones de hidrógeno desde el endosoma son bombeados dentro de la partícula viral vía la proteína de canal iónico M2. La proteína M2 es el blanco de las amantadinas, drogas anti-influenza que bloquean la actividad del canal iónico y previenen la liberación de la envoltura. La acidificación interna del virión de influenza disgrega las interacciones proteína-proteína internas, permitiendo que las RNPs sean liberadas al citoplasma (White 1990).

6.5.3 Síntesis de RNA viral

Una vez liberadas del virión, las RNPs son transportadas al núcleo celular por medio de señales de localización nuclear de proteínas virales, las cuales dirigen proteínas celulares para importar las RNPs. El núcleo es la localización de toda la síntesis de RNA viral, tanto de los RNA mensajeros poliadenilados y con capuchón (cap) que actúan como templado para la traducción de proteínas virales en la célula hospedera como de los segmentos de RNA que forman el genoma de la progenie viral. La RNA polimerasa viral usa el RNA viral de sentido negativo como templado para la síntesis de dos especies de RNA positivo: RNA mensajeros y RNA complementario (RNAc), intermediario. Los RNAs positivos sintetizados son utilizados en la transcripción subsecuente de las nuevas copias de RNA genómico viral (RNAv). El tallo de Poli(A) de los RNA del virus influenza está codificado en el RNAv como una fracción de 5 a 7 residuos de uracilo. El “capping” de los RNA mensajeros ocurre de una manera única en la cual las proteínas PB1 y PB2 roban los primers capeados de los transcritos pre-RNAm del hospedero para iniciar la síntesis del RNAm viral, este proceso es llamado “secuestro del capuchon”. La transcripción da lugar a 8 transcritos primarios (7 en caso de influenza tipo C). Dos de estos segmentos dan lugar a un transcrito primario que puede tener un procesamiento alternativo de su RNAm, dando como resultado dos transcritos alternativos. El segmento M da lugar a dos RNAs alternativos que codifican para la proteína M1 y la proteína M2.

Los RNAm virales son transportados y traducidos igual que los mensajeros celulares, sin embargo la exportación nuclear de los segmentos de RNAv es mediada por las proteínas M1 y NEP/NS2. La proteína M1 interactúa con los RNAv y las NP formando con estos dos componentes el complejo RNP, M1 se asocia con la proteína NEP de exportación nuclear, la cual media la exportación nuclear de M1-RNP al citoplasma vía las nucleoporinas (Bouvier y Palesse, 2008).

6.5.4 Síntesis de proteínas virales

Las proteínas de envoltura HA, NA, y M2 son sintetizadas por los RNAm virales en los ribosomas unidos a la membrana de retículo endoplásmico, donde son plegadas y transportadas al aparato de golgi para modificaciones post-traduccionales. Las tres proteínas tienen señales apicales que las dirigen hacia la membrana celular para el ensamble del virión. Se cree que M1 que juega un papel en conducir el complejo RNP-NEP en contacto con las proteínas de envoltura para el embalaje con la membrana del hospedero (Bouvier y Palesse, 2008).

6.5.5 Morfogénesis del virus

Los virus influenza no son completamente infecciosos a menos que los viriones contengan un genoma completo de 8 segmentos (7 para influenza C). El empaquetamiento de los RNAv no es un proceso aleatorio en el cual los segmentos se incorporan al azar y sólo aquellos con el genoma completo son infecciosos. Nuevas evidencias sugieren que es un proceso selectivo en el cual señales discretas de empaquetamiento de todos los segmentos de RNAv aseguran que un genoma completo sea incorporado en la mayoría de las partículas virales (Bouvier y Palesse, 2008).

6.5.6 Salida de la progenie viral

El brote de los virus influenza ocurre en la membrana celular y probablemente inicia con la acumulación de proteína de matriz M1 en el bicapa lipídica del lado del citoplasma. Los “spikes” de HA se unen por el ácido siálico en la membrana celular, hasta que las partículas virales son activamente liberadas por la actividad sialidasa de la proteína NA.

La NA es un tetrámero en forma de hongo anclado a la envoltura viral por un dominio transmembranal y posee actividad destructora del receptor. Los residuos de ácido siálico cortados de las glicoproteínas de la superficie celular y gangliósidos liberan la progenie viral de la célula hospedera. La NA también remueve residuos de ácido siálico de la misma envoltura viral con lo que previene agregación de partículas virales. La NA también ayuda a la infectividad por rompimiento de la mucina en secreciones del tracto respiratorio y permite al virus penetrar a través del epitelio respiratorio (Bouvier y Palesse, 2008).

6.6 Generación de nuevos virus

Los virus de influenza experimentan un proceso de evolución continua mediada por mutaciones que les permiten adaptarse al hospedero y a las condiciones del ambiente, lo cual se conoce como presión selectiva o evolución obligada. Estas mutaciones—sustituciones de nucleótidos, inserciones, y deleciones de tripletes—son causadas principalmente por errores de la enzima polimerasa de RNA durante la transcripción, y

ocurren en cada uno de los 8 segmentos genómicos del virus. Las mutaciones se van acumulando en cada ciclo de transcripción y generan variantes de estructura o función de las proteínas que expresan.

Las mutaciones que se acumulan en los virus en aves domésticas y mamíferos originan cambios en los aminoácidos y generan alteraciones importantes en su comportamiento biológico. Estas alteraciones es lo que les permiten infectar especies diferentes, seleccionar poblaciones que no sean reconocidas por la respuesta inmune, generar familias resistentes a agentes antivirales, o cambiar su tropismo celular, con lo que modifican su patogenicidad (Noda *et al.*, 2006; Garcia-Garcia, 2006).

Podemos agrupar las variaciones antigénicas que se producen en este tipo de virus en dos tipos:

6.6.1.- Variación genética: Debido a los reordenamientos en el genoma de los virus de la influenza A una célula puede estar infectada simultáneamente por dos virus diferentes. Los viriones descendientes pueden contener mezclas de los genes de los virus paternos. Añadiendo a esta propiedad la habilidad del virus de influenza A para infectar animales que viven cercanos a los humanos, se propicia una situación en la cual infecciones dobles con virus humano y no humano originan un resultado impredecible de nuevas cepas con composiciones genéticas muy diferentes. Este reordenamiento de cepas puede darse también entre dos cepas de origen humano. Si estos cambios se dan en los genes que codifican para la HA, NA, o ambas, la cepa resultante del reordenamiento tendrá una ventaja selectiva frente al sistema inmune de la población. De esta forma el cambio genético puede causar epidemias de influenza A (Steinhauer y Skehel, 2002; Garcia-Garcia, 2006).

6.6.2.- Variación antigénica: Los virus de RNA, como el virus de la influenza, tienden a tener tasas de mutación 10,000 veces mayor que los de DNA. Estas mutaciones también pueden llegar a dar cambios en el material genético y desde aquí producir cambios en los polipéptidos víricos, los cuales sufren dos a tres sustituciones de aminoácidos cada año. La capacidad de las cepas de propagarse en la comunidad depende de si se ven afectados los antígenos de HA y NA.; pero Yya que los cambios cambios antigénicos son menos pronunciados en el cambio antigénico estas cepas tienden a causar brotes localizados mas que grandes epidemias (Hollenbeck, 2005; Noda *et al.*, 2006).

6.7 Especificidad del hospedero y saltos inter-especie

Hay muchos factores que determinan si una especie puede actuar como anfitriona de una infección. El factor más evidente es el contacto prolongado entre el hospedero y el patógeno de la infección a ocurrir. Esto hace que algunas especies tengan más probabilidad de infectarse que otras. El reservorio natural de los virus de la influenza son las aves acuáticas en las cuales los virus parecen haber alcanzado un nivel óptimo de la adaptación al anfitrión. La transmisión entre las aves ocurre directa o indirectamente a

través de aerosoles, contaminación fecal del agua, de los alimentos, o de otros materiales. El espectro de la infección en pájaros se extiende desde la infección asintomática, la enfermedad respiratoria leve, a una enfermedad severa y rápidamente fatal, lo que conlleva a la muerte del animal. Los virus aviáres de la influenza capaces de causar brotes de enfermedad severa en pollos o pavos se clasifican como altamente patógenos y se restringen actualmente a los subtipos H5 y H7. Las infecciones de las aves de corral por influenza aviaria altamente patógena se caracterizan por la infección diseminada, la producción disminuida de huevo, molestias respiratorias, lagrimeo abundante, edema de cabeza, diarrea, síntomas neurológicos, y muerte (Anders, 2006; de Jong y Hien, 2006).

La preferencia por una especie de anfitrión en particular se determina por la unión precisa entre proteínas HA y los receptores que contienen ácido siálico. La HA se une a receptores que contienen ácidos siálicos en su extremo terminal, es ahí donde la unión precisa entre proteína y receptor determina la preferencia por una especie de huésped en particular. Un interruptor es la especificidad del receptor de los ácidos siálicos conectados con galactosa. En aves el enlace es $\alpha 2-3$ mientras que en mamíferos es de $\alpha 2-6$. Esta diferencia impide que los virus de la influenza A crucen la barrera de la especie y se adapten a un nuevo anfitrión. Estudios realizados con HA han demostrado que unas pocas sustituciones de aminoácidos son suficientes para generar cambios en la afinidad del dominio de la proteína hacia su receptor. Además se ha encontrado que ligeras modificaciones en la estructura secundaria de la proteína puede exponer ciertos residuos que sirven de unión al receptor de una manera más directa que otras conformaciones (Hilleman, 2002).

La influenza frecuentemente causa enfermedades respiratorias en los cerdos. Los cerdos tienen subtipos específicos de estos virus, pero también son susceptibles a cepas humanas y aviáres. Esto se debe en parte a la presencia de ambos tipos de enlaces, $\alpha 2-3$ y $\alpha 2-6$, vinculados a ácido siálico en el epitelio respiratorio. Los seres humanos pueden verse afectados por las cepas transmitidas por los cerdos. Los cerdos son reservorios del virus, y un vehículo para que las cepas de virus puedan tener recombinaciones que pudiesen dar origen a la creación de un subtipo de alta patogenicidad capaz de infectar tanto al hombre como a otros animales (Anders, 2006; de Jong y Hien, 2006).

6.8 Influenza pandémica e influenza estacional

En los periodos entre las pandemias, las cepas de virus de la influenza que circulan principalmente en los seres humanos causan enfermedades respiratorias al infectar el epitelio de revestimiento de las vías respiratorias y se propagan por las secreciones respiratorias. Actualmente en la población humana circulan los subtipos H3N2 y H1N1. Las epidemias de influenza se producen principalmente en la temporada de invierno, de octubre a abril en el hemisferio norte y de mayo a septiembre en el hemisferio sur. En regiones tropicales, esta enfermedad puede ocurrir durante todo el año. La mayoría de las veces la infección por el virus es auto limitante, con una repentina aparición de fiebre

alta, malestar, tos, y dolor de cabeza y muscular. Los síntomas prevalecen durante un máximo de dos semanas y requiere un promedio de 3– días de reposo en cama. La enfermedad puede ser grave y a veces mortal en niños pequeños, ancianos, pacientes inmunosuprimidos, y las personas con enfermedades subyacentes, tales una enfermedad cardíaca o asma (Anders, 2006). Debido a su alta incidencia, el virus tiene un enorme impacto sobre las economías de todo el mundo, dependiendo de la gravedad de la epidemia. En los climas templados se infecta entre el 2% y el 15% de la población.

Cuando un subtipo de virus de influenza A, al que la población humana no ha experimentado sido expuesta y, por tanto, no tiene inmunidad, empieza a extenderse, la propagación puede ser rápida y causar brotes simultáneos en todo el mundo, que dan lugar a una pandemia. Las pandemias en los seres humanos causadas por virus de la influenza A se producen a intervalos irregulares. La gravedad de la pandemia varía con el subtipo y esta cepa puede comportarse de manera diferente a la epidemia estacional. Por ejemplo, la cepa que causó la gripe española fue responsable de altas tasas de mortalidad en los individuos jóvenes y sanos, y la difusión fue durante los meses de verano (Fanning *et al.*, 2002; Pinon, 2005; Anders, 2006).

6.9 Pandemias de influenza A

Durante los años 1918-1920 ocurrió uno de los más devastadores brotes de enfermedad en la historia de la humanidad. El brote, conocido como la “gripe española”, causó la muerte de 20 a 40 millones de personas alrededor del mundo, lo que representó el de 2.5% al 5% de la población global, y se calcula que infectó al menos al 20% de la población mundial. Los primeros casos clínicos documentados fueron encontrados en los Estados Unidos, y una teoría alternativa afirma que los reclutas llevaron con la enfermedad a Europa al viajar hacia la Primera Guerra Mundial. Mediante el análisis de los restos exhumados de un individuo enterrado en el ártico, donde se había congelado en permafrost desde el brote de 1918, fueron capaces de recuperar RNA suficiente para determinar el subtipo causante de la pandemia española, el virus AH1N1.

Las otras pandemias, aunque menos devastadoras que la gripe española, causaron alta morbilidad y provocaron la muerte de seis millones de personas en todo el mundo. La segunda de estas pandemias, la denominada gripe asiática, ocurrió durante 1957–1958, y fue causada por el subtipo AH2N2. Entre 1968 y 1970, el subtipo AH3N2 causó una pandemia conocida como “gripe de Hong Kong”. Entre 1977 y 1978 una leve pandemia del subtipo AH1N1, que afectó principalmente a los jóvenes. Esta cepa es la que actualmente co-circula en las poblaciones humanas junto con el subtipo H3N2 de Hong Kong de la pandemia de 1968.

Basándonos en éstos patrones, se puede esperar que las pandemias ocurran en promedio de tres a cuatro veces cada siglo, pero aun no hay forma de predecir cuándo aparecerá la próxima.

El primer brote documentado de influenza aviar en una población de aves silvestres fue en 1961, cuando un en el charran común provocó 1600 muertes de aves en el sur de África. Este brote sugirió que las aves silvestres son un posible reservorio del virus. El peor brote de influenza A aviar patogénica en los tiempos modernos es el que actualmente asola a los países asiáticos y algunos países de África. El brote de julio del 2006 condujo a la muerte o el sacrificio de más de 100 millones de aves y ha ocasionado la infección de 387 personas de las cuales 245 han muerto en 15 países.

6.10 Pandemia de influenza AH1N1 en el 2009

El reporte del 11 de noviembre del 2009 de la Organización Mundial de la Salud (WHO) informó que en todo el mundo más de 199 países han confirmado casos de influenza H1N1 en la pandemia 2009 que desafortunadamente ha causado más de 6000 muertes. Como muchos países han dejado de contar los casos individuales, el recuento de casos es probable que sea significativamente menor que el número real de casos que han ocurrido.

Actualmente, la transmisión de la influenza sigue siendo reportada en América del Norte sin pruebas de un pico en la actividad. El 42% de las muestras respiratorias fueron positivos para la influenza A y el 100% corresponde al subtipo H1N1. En Europa y Asia Central y Occidental, la actividad de la pandemia de influenza fue detectada en muchos países, señalando un inusual comienzo temprano de la temporada de la influenza de invierno. Actualmente, de acuerdo a los datos reportados en la WHO se presenta evidencia de una creciente y activa transmisión del virus de la influenza pandémica a través de Europa con inclusión de Ucrania y Bielorrusia y el este de Rusia (WHO informe 73, 2009).

En México, la Secretaria de Salud reportó el 19 de Julio del 2010 un total de 72,548 casos confirmados y 1,316 defunciones siendo las entidades federativas más afectadas el Distrito Federal con 6,765 casos, Chiapas con 3,607 casos, Estado de México con 3,415 casos y Nuevo León con 3,383 casos.

6.11 Co-infección del virus de influenza con otros patógenos asociados a enfermedades respiratorias.

La influenza estacional y la influenza pandémica frecuentemente se complican por infecciones bacterianas. La co-infección bacteriana ha sido encontrada en alrededor del 30% de todos los casos con influenza estacional y los patógenos más frecuente reportados incluyen *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Torres *et al.*, 2012)

La co-infección bacteriana es un importante contribuidor a la morbilidad y a la mortalidad. La neumonía bacteriana que complica la infección por influenza fue una de

las principales causas de muerte durante la pandemia de influenza española de 1918 y durante periodos de actividad de la influenza estacional en los periodos inter-pandémicos. Durante la pandemia de 1918-1919 las bacterias que fueron encontradas frecuentemente del esputo, pulmones y sangre de pacientes con neumonía, vivos o muertos, eran bacterias colonizadoras de las vías respiratorias superiores de personas sanas (*Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, y/o *Staphylococcus aureus*; Brundage y Shanks 2008).

La co-infección bacteriana fue reportada frecuentemente en casos letales durante la influenza AH1N1 pandémica del 2009, siendo *S. pneumoniae* el patógeno más frecuentemente identificado. Estudios en poblaciones específicas (pacientes críticamente enfermos) demostraron la presencia de co-infección bacteriana en el rango de 18% a 33% de los pacientes con influenza AH1N1 que presentaron neumonía viral (Torres, 2012).

6.12 Vigilancia epidemiológica y técnicas diagnósticas

Las enfermedades respiratorias febriles humanas son un problema de salud que representa una carga económica anual importante para todo el mundo. Existe una gran diversidad de agentes patógenos que causan este tipo de enfermedades, desde las bacterias como *Haemophilus influenzae* al virus respiratorio sincitial o los virus que cambian genéticamente en un tiempo relativamente corto, tales como los *Rinovirus humanos* (HRV) (Malhotra *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2000), que hacen más difícil el diagnóstico diferencial. Los brotes recientes de gripe aviar y la pandemia de influenza humana que se manifiesta en este momento ponen al descubierto la necesidad de un programa constante de vigilancia epidemiológica. (Sebastian *et al.*, 2009).

La vigilancia mundial de la influenza es fundamental para la mejora del manejo de la enfermedad, y es especialmente importante para la detección temprana que permita identificar rápidamente la propagación de brotes e intervenir rápidamente, potencialmente reduciendo los efectos de una epidemia.

La vigilancia epidemiológica requiere de técnicas rápidas, que sean de bajo costo y tengan una buena capacidad de análisis. Uno de los métodos tradicionales para la detección del virus de la influenza es el cultivo viral acompañado de la tipificación serológica del HA. Sin embargo, éste es un método lento, que tarda 7 días en arrojar resultados concretos.

La pandemia de la influenza tipo AH1N1 ha permitido el desarrollo de una gran cantidad de pruebas serológicas rápidas también denominadas pruebas de escritorio, que indican la presencia del virus sin embargo no tienen la sensibilidad y ni la especificidad de las pruebas moleculares (Likitnukul 2009; Vasoo 2009). La reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) se utiliza habitualmente para la detección rápida del virus de la gripe aviar (AIV) en muestras clínicas, pero las sustancias inhibidoras

presentes en algunas muestras clínicas, puede reducir o bloquear la amplificación por PCR (Das, 2009).

Hoy en día se utilizan una gran cantidad de técnicas diagnósticas de nueva generación como son varias tecnologías como el sistema Masscode™ multiplex mediante qPCR (Lin 2009), Luminex® xMAP™ (Lin 2009; Wang 2008) y microarreglos de oligonucleótidos que ofrecen alternativas rápidas y sensibles que actualmente están en desarrollo como plataformas de diagnóstico muy eficientes que son capaces de detectar e identificar simultáneamente un gran número de diversos patógenos respiratorios virales y bacterianos. Sin embargo, el alto grado de mutabilidad del virus de la gripe representa un desafío en el diseño de éstas nuevas metodologías. Estas deben proporcionar información para una amplia gama de cepas de virus y linajes.

6.13 Uso de microarreglos

A finales de los años 80, la tecnología que desembocaría en la plataforma GeneChip fue desarrollada por cuatro científicos, en Affymetrix: Stephen Fodor, Michael Pirrung, Leighton Read y Lubert Stryer. El proyecto original estaba destinado a la construcción de péptidos sobre chips, pero desembocó en la capacidad para construir secuencias de DNA sobre chips. La aplicación práctica de esta idea se llevó a cabo por la empresa Affymetrix que comenzó a actuar como una compañía independiente en el año 1993.

Los microarreglos por lo tanto, surgieron de la combinación de las técnicas microelectrónicas y el empleo de materiales biológicos. Se basan en la ultra miniaturización y paralelismo implícito y se concretan en chips de material biológico de alta densidad de integración válidos para realizar distintos tipos de estudios repetitivos con muestras biológicas simples.

Un microarreglo de DNA es una superficie sólida a la cual se unen y en un orden predefinido, una serie de fragmentos de DNA. Las superficies empleadas para fijar el DNA son muy variables y pueden ser vidrio, plástico e incluso chips de silicio. Los arreglos de DNA son utilizados para averiguar la expresión de genes, monitoreando los niveles de miles de ellos de forma simultánea, los métodos para medir la expresión de genes que antecedieron a los microarreglos, fueron el Southern Blot, que transfiere las muestras de DNA a una membrana, el Northern Blotting que transfiere RNA y la qPCR.

Los microarreglos basados en la hibridación utilizan moléculas de ácidos nucleicos (DNA, DNAs u oligonucleótidos) que funcionan como sondas y se hibridan con ácidos nucleicos completamente provenientes de la muestra en estudio, los cuales han sido marcados por diferentes métodos. Generalmente, los blancos se generan a partir de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de la célula o tejido de interés que se convierte en DNAc. Se necesitan en promedio 1 a 2 microgramos de RNAm o 10 microgramos de RNA para usarlos en el microarreglo. Los blancos están marcados con material fluorescente (Cy3, Cy5 o Biotina) que luego puede ser detectado mediante foto imagen o

escáner de fluorescencia. Posterior a la hibridación se debe hacer la lectura, La marca fluorescente de los residuos se hace evidente mediante láser, cámara y microscopio que crean una imagen digital del microarreglo. Estos datos se llevan al computador y un programa analiza la emisión de colores. Cada hibridación detectada como un punto en el microarreglo se asocia con un gen particular.

6.14 Ventajas de los microarreglos RPM

La tecnología de microarreglos es similar a los procedimientos de PCR en complejidad, pero presenta la ventaja de ser muy rápida, pues puede ser realizada en 24 horas y requiere poco personal técnico para su realización.

Los resultados obtenidos proporcionan información sobre las secuencias nucleotídicas de los patógenos y no genera falsos positivos. El análisis de las variaciones nucleotídicas de los virus y patógenos en general, así como de las mutaciones específicas contribuyen a predecir la patogenicidad y la fármaco-resistencia de los patógenos analizados.

El microarreglo RPM contiene un gran número de moléculas de DNA ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que forma una matriz de secuencias en dos dimensiones. Estos oligonucleótidos llamadas “sondas” son secuencias cortas, o de mayor tamaño, DNAs, o bien productos de PCR de una sola hebra inmovilizados en el soporte. Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan y se incuban sobre el panel de sondas, donde se unirán a sus secuencias complementarias inmovilizadas en el soporte del microarreglo, permitiendo la identificación de los DNAs presentes en la muestra. Posteriormente, el escáner y las herramientas informáticas permiten interpretar y analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas.

Una buena alternativa es la plataforma de alta densidad con re-secuenciamiento mediante microarreglos en la versión de Microarreglos para Patógenos Respiratorios 1 (RPM v.1). Esta metodología ha demostrado tener éxito en identificar una amplia gama de agentes patógenos (incluyendo bacterias y los virus de DNA y RNA) en una sola prueba con una alta sensibilidad y especificidad que presentan múltiples ventajas con otras tecnologías usadas (Bouvier y Palese 2008). Además, la plataforma v.1 RPM ha demostrado la capacidad de discriminar entre las cepas conocidas y desconocidas así como nuevas variantes de los patógenos: Esta plataforma permite la detección simultánea y la identificación diferenciada de todos los subtipos de los genes HA y NA de la influenza A en un solo microarreglo. Este microarreglo RPM contiene aproximadamente el 30% (41 063 pb) al estudio de de los alelos 16 HA y 9 de NA de los virus de la gripe aviar.

La re-secuenciación de patógenos con microarreglos (RPM) contiene secuencias diseñadas y construidas para permitir la cobertura completa de 86 agentes bacterianos y

virales, incluyendo patógenos respiratorios y de organismos zoonóticos considerando los riesgos significativos para la salud humana, por ejemplo, SARS.


6.15 Microarreglo RPM-Flu 3.1 TessArray

El ensayo de microarreglo RPM-Flu 3.1 TessArray detecta e identifica simultáneamente patógenos, tanto virales como bacterianos, conocidos y desconocidos del tracto respiratorio superior.. Esta matriz ofrece una cobertura completa del virus de la gripe, incluyendo virus de la gripe aviar, identificando género, especie, serotipo, y cepa viral. Este microarreglo proporciona una detección completa de la categoría de la influenza A, B, y parainfluenza, así como diversos patógenos microbianos y virales estrechamente relacionados con las enfermedades respiratorias como se muestra en la figura 3.

El microarreglo TessArrae RPM-Flu 3.1 ha sido usado anteriormente para la detección y la identificación de los subtipos AH1N1, AH3N2 AH5N1 y también para la detección e identificación del tipo B del virus de influenza en instalaciones de entrenamiento del ejército de los Estados Unidos de América. Se demostró que la plataforma RPM tiene mayores ventajas que los métodos tradicionales de detección de influenza como el qPCR. La principal ventaja es la identificación del gen de neuraminidasa por parte de la plataforma RPM ya que logra distinguir los subtipos antes mencionados por medio de las 9 diferentes A/HN subcategorías y por medio de 144 combinaciones de variaciones de los subtipos A/HN del virus de influenza (Metzgar *et al.*, 2010).

Otro estudio demostró la capacidad del microarreglo RPM-Flu 3.1 para detectar y diferenciar todos los subtipos HA y NA. Los autores caracterizaron 37 virus de influenza aviar colectadas en el Medio Oriente. Este estudio comparó efectivamente la utilidad de la plataforma RPM con respecto a la detección tradicional del virus de la influenza aviar (qPCR).

Veintiun muestras fueron identificadas con el subtipo H5 por todos los métodos tradicionales. Tres muestras no tuvieron resultados por el microarreglo y fueron positivas para AH5N1 por qPCR, Dos muestras identificadas para influenza A por el microarreglo fueron negativas por qPCR. De las restantes 11 muestras, seis fueron identificadas como otros serotipos del virus de influenza y cinco fueron identificadas como influenza A por el microarreglo. El método qPCR demostró solo identificación de especie mientras que el microarreglo logró identificar el subtipo del virus de influenza aviar (AH5N1, AH7N7 o AH10N70; Lin *et al.*, 2009).



TessArray® RPM-Flu 3.1

Influenza A HA1 Influenza A HA Influenza A HA Influenza A HA Influenza A HA Influenza A HA Influenza A HA Influenza A HA Influenza A HA9 Influenza A HA10 Influenza A HA11 Influenza A HA12 Influenza A HA13 Influenza A HA14 Influenza A HA15 Influenza A HA16 Influenza A NA1 Influenza A NA2 Influenza A NA3 Influenza A NA4 Influenza A NA5 Influenza A NA6 Influenza A NA7 Influenza A NA8 Influenza A NA9 Influenza A Mtx Influenza A NS Influenza A PB2	Influenza B HA1 Influenza B HA2 Influenza B NA Influenza B Mtx Adenovirus B Adenovirus C Adenovirus D Adenovirus E Coronavirus (229E) Coronavirus (OC43) Coronavirus (NL63) Coronavirus (SARS Urbani) Cytomegalovirus (HHV-5) Enteroviruses: • Coxsackievirus (5 types) • Echovirus (8 types) • Rhinovirus (27 types) Measles Virus Metapneumovirus (types A, B) Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Parainfluenza 4a Parainfluenza 4b RSV A RSV B Rubella Virus	 <i>Bordetella pertussis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydophila pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Variola major</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Francisella tularensis</i> <i>Yersinia pestis</i>
---	--	--




Figura 3. Lista de patógenos detectados con el microarreglo RPM-Flu 3.1. Estos incluyen influenza A,B, Parainfluenza, Adenovirus, Coronavirus, Rubeola y una gran cantidad de patógenos microbianos.

6.15.1 Análisis de la base de datos RMP-Flu

Los resultados obtenidos de la base de datos de los ensayos de las secuencias generadas de cada espécimen a través del detector de títulos de Affymetrix CustomSeq-formatted microarrays y la imagen de datos adquirida del GeneChip Instrument System Scanning bajo el control del software GeneChipOperating es transcrito por el software análisis de secuencia GSEQ.

7. HIPÓTESIS

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los virus de la influenza y patógenos asociados en la población de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México, permitirá detectar la presencia de diferentes tipos y subtipos del virus y los patógenos asociados a enfermedades respiratorias.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Determinar la presencia de diferentes tipos y subtipos del virus de la influenza y su co-infección con patógenos asociados a enfermedades respiratorias en la población de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México.

8.2 Objetivos particulares

- 1) Estandarizar las condiciones para la detección de influenza y patógenos asociados con el uso del microarreglo RPM Flu-3.1.
- 2) Determinar la presencia de diferentes tipos y subtipos del virus de la influenza en la población de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México
- 3) Analizar la infección o co-infección de patógenos asociados a enfermedades respiratorias en muestras con influenza de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México.

9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

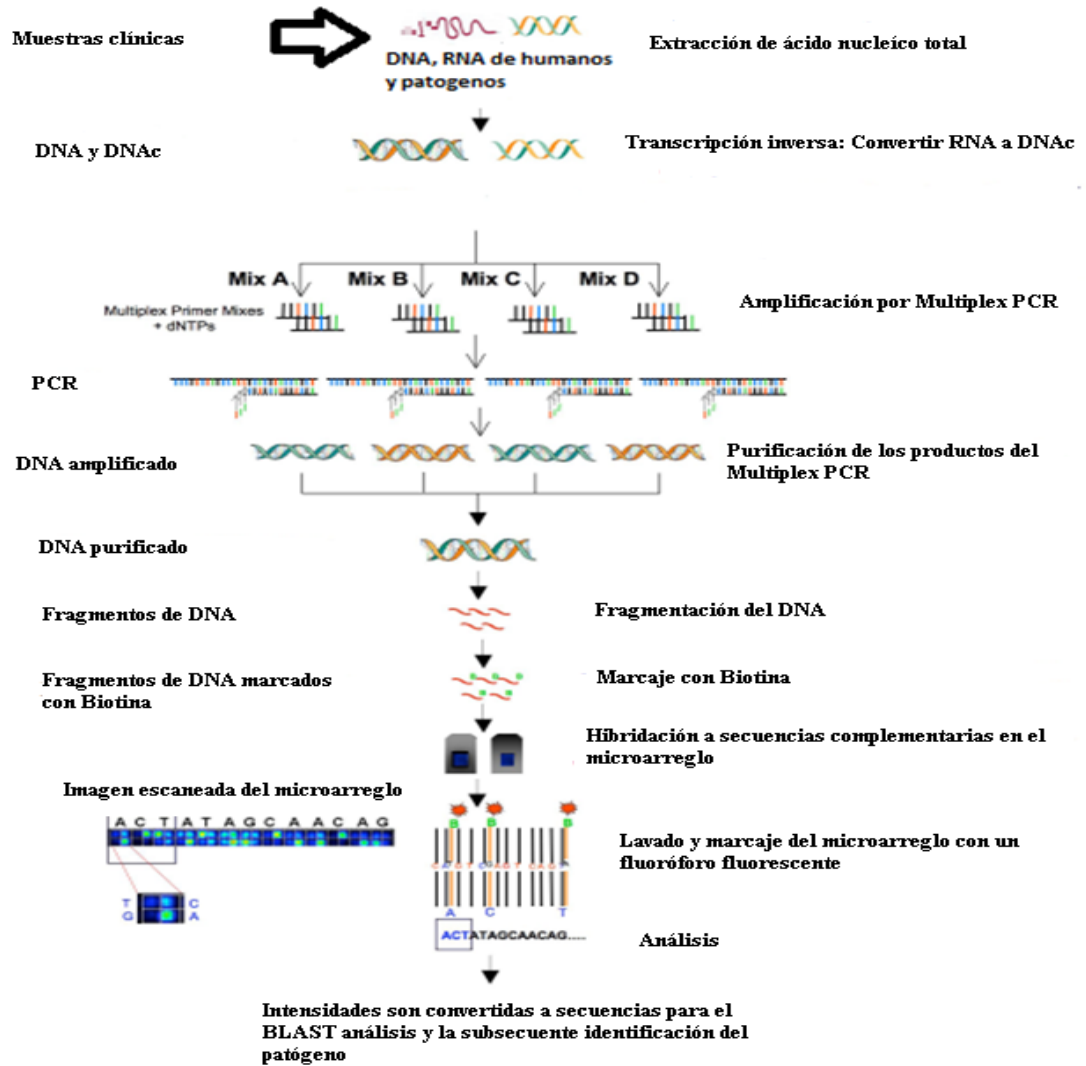


Figura 4. Estrategia experimental. La estrategia consistió en la extracción de los ácidos nucleicos totales de las muestras colectadas y la transcripción inversa para convertir los RNAs virales a DNAs. Posteriormente, se amplificaron por medio de PCR multiplex, se fragmentaron, se marcaron con biotina y se hibridaron en el microarreglo RPM-Flu que fue lavado, fijado y escaneado para el análisis de las secuencias nucleotídicas resultantes.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Colecta de Muestras

Se obtuvieron 233 muestras de exudados faríngeos, de las cuales 88 fueron proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud pública de Oaxaca, Oaxaca (LESPO) y 145 fueron proporcionadas por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste-IMSS, Monterrey, Nuevo León (CIBNI). Todas las muestras fueron analizadas por el microarreglo RPM-Flu 3.1 con el procedimiento que se muestra a continuación:

10.2 Extracción de ácidos nucleicos totales

La extracción de los ácidos nucleicos totales se realizó utilizando el kit de aislamiento de DNA y RNA MasterPure (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). A una alícuota de 450 μ L de la muestra clínica se le adicionaron 450 μ L de Buffer de lisis 2X T & C y 3 μ L de proteinasa K (50 μ g/ μ L). Se agitó por inversión 15 veces y posteriormente se incubó a 65 °C por 15 minutos. Durante ese periodo, se realizó agitación con vórtex cada 5 minutos y se enfrió en hielo por 4 minutos. En seguida, se adicionaron 450 μ L del reactivo de precipitación de proteínas (MPC) y se agitó en vórtex por 10 segundos. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido se separó en dos tubos de 1.5 ml, obteniendo así 650 μ L en cada uno de ellos.

A continuación, se agregaron 750 μ L de isopropanol y se mezcló por inversión 40 veces. Después, se centrifugaron ambos tubos a 10,000 g por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 375 μ L de etanol al 70% (v/v) a cada tubo. En seguida, se centrifugó a 10,000 g a temperatura ambiente por un minuto. Finalmente, se extrajo el etanol cuidadosamente y el precipitado resultante se solubilizó en 35 μ L de Buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

10.3 Cuantificación de los Ácidos nucleicos totales

Posteriormente, a la extracción de los ácidos nucleicos totales se procedió a realizar la cuantificación y la calidad de los ácidos nucleicos totales mediante la determinación de la relación 260/280 del RNA utilizando el NanoDrop 2000c.

10.4 Síntesis de los DNAs complementarios al RNAm (DNACs)

Después de la extracción de ácidos nucleicos totales, se realizó la síntesis de DNACs a partir de los RNA usando la técnica de transcripción reversa (RT). Se añadió 4µL de ácido nucleico total purificado a un tubo RPM-Flu 3.1 (proporcionado por TessArray® RPM-Flu 3.1). Se agitó mediante vortex y se centrifugó brevemente. Se incubó a 65 °C por 5 minutos en un termociclador Eppendorf Mastercycler y luego se enfrió en hielo por 5 minutos.

En un tubo Eppendorf de 1.5ml se preparó la mezcla de transcripción reversa como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la mezcla de transcripción reversa

Mezcla de transcripción reversa	1 muestra
Buffer para cadena sencilla 5X	4µL
DTT 0.1M	2µL
RNaseOUT 40 U/µL	1µL
RNA polimerasa Superscript III 200 U/µl	1µL
Volumen Total	8µL

Se transfirieron 8µL de la mezcla de transcripción reversa al tubo RPM-Flu 3.1 RT, se mezclaron por pipeteo y se colocaron en el termociclador Eppendorf Mastercycler programado con el siguiente programa:

25 °C–10 minutos

50 °C–50 minutos

85 °C–5 minutos

La muestra resultante RPM-Flu 3.1 RT se colocó en hielo para su posterior amplificación mediante Multiplex PCR.

10.5 Amplificación mediante Multiplex PCR

La muestra RPM-Flu 3.1 RT fue amplificada con 4 diferentes cocteles de primers multiplex, así que la muestra RPM-Flu 3.1 RT fue dividida en 4 tubos RPM-Flu 3.1 PCR mix (A,B,C y D) con 5 µL en cada uno. En hielo se preparó la mezcla de PCR Multiplex en un tubo Eppendorf de 1.5ml como se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Preparación de la mezcla maestra Multiplex PCR

Mezcla maestra Multiplex PCR	1 muestra
Buffer GoTaq Flexi 5X	44µL
MgCl ₂ 25 mM	35.2µL

DNA polimerasa GoTaq 5U/ μ L	8.8 μ L
UDG 0.22 KU / 220 μ L	4.4 μ L
Volumen Total	21 μ L

Se transfirieron 21 μ L de la mezcla maestra PCR Multiplex a cada tubo RPM-Flu 3.1 PCR Mix (A,B,C y D).

Se colocaron los 4 tubos RPM-Flu 3.1 PCR Mix en un termociclador Biorad Peltier DNA Engine Tetrad 2 y se utilizó el siguiente programa:

- 1) 24°C por 10 minutos
- 2) 94°C por 2 minutos
- 3) 94°C por 30 segundos
- 4) 45°C por 30 segundos
- 5) Incrementar la temperatura 1°C cada ciclo
- 6) 72°C por 1 minuto y 30 segundos
- 7) Ir al paso tres 15 veces
- 8) 94°C por 30 segundos
- 9) 60°C por 2 minutos
- 10) Ir al paso siete 23 veces

Se colocaron los productos RPM-Flu 3.1 PCR en hielo (A,B,C y D)

10.6 Purificación de las muestras de DNAc

La purificación de las muestras amplificadas se realizó utilizando el kit de purificación QIAQuick PCR (QIAGEN, Valencia, CA).

A temperatura ambiente se combinaron los cuatro productos RPM-Flu 3.1 PCR en un solo tubo Eppendorf de 1.5ml y se le adicionaron 1000 μ L de DNA binding buffer (PB). Se pipetearon 700 μ L de la muestra a una columna de purificación Qiagen QIAQuick PCR y se centrifugó por 30 segundos a 13,000 rpm a temperatura ambiente, la columna se puso en un nuevo tubo de 2ml. Se repitió el paso anterior con lo que resta de la muestra.

La columna se transfirió a un nuevo tubo de 2ml y se añadieron 730 μ L de wash buffer (PE) a la columna y se centrifugó por 30 segundos a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Se transfirió la columna a un nuevo tubo y se volvió a centrifugar por 30 segundos a 13,000 rpm a temperatura ambiente para remover todos los trazos del wash buffer.

Se volvió a transferir la columna a un nuevo tubo de 1.5ml y se le adicionaron 25 μ L de elution buffer (EB). Se dejó reposar la columna por 1 minuto. Se centrifugó la columna por 30 segundos a 13,000 rpm a temperatura ambiente.

La columna se desechó y el tubo con la mezcla de productos de PCR Multiplex eludido se colocó en hielo.

10.7 Fragmentación y marcaje de la muestra de DNAC

Los reactivos que se utilizaron para la fragmentación y marcaje de la muestra son parte del kit de GeneChip Resequencing Assay (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA.)

En un tubo nuevo de 1.5ml se preparó la mezcla de fragmentación maestra como se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Preparación de la mezcla de fragmentación maestra

Mezcla de Fragmentación maestra	1 Muestra
Buffer de Fragmentación 10X	2.5 μ L
Reactivo de Fragmentación	0.1 μ L
Volumen total	2.6 μ L

Al tubo que contiene la mezcla de fragmentación maestra se le adicionó el pool del producto del PCR Multiplex eludido y se mezcló por pipeteo. Posteriormente, se colocó la muestra en un termociclador Eppendorf Mastercycler y se usó el programa siguiente:

37 °C–5 minutos

95 °C–10 minutos

El producto resultante de la amplificación Multiplex fragmentada se colocó en hielo mientras se preparó la mezcla de marcaje. Posteriormente, en un nuevo tubo de 1.5ml se preparó la siguiente mezcla de marcaje como se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Preparación de la mezcla de marcaje

Mezcla de marcaje	1 muestra
Buffer TdT Affymetrix 5X	7.2 μ L
Reactivo de marcaje Affymetrix	1.2 μ L
TdT Affymetrix TdT 30U/ μ L	2 μ L
Volumen Total	10.4 μ L

Al tubo que contiene el producto Multiplex PCR se le adicionaron 10.4 μ L de la mezcla de marcaje. Posteriormente, se colocó el tubo en un termociclador y se usó el siguiente programa:

37 °C–30 minutos

95 °C–5 minutos

Se colocó el producto resultante marcado Multiplex PCR en hielo mínimo 5 minutos antes de agregarle la mezcla de hibridación.

10.8 Hibridación, lavado y escaneado de la muestra

Se incubaron los microarreglos en el horno de hibridación (Affymetrix GeneChip Microarray modelo 640) por un mínimo de 10-15 minutos a temperatura ambiente. Mientras que los microarreglos se incubaron, se abrió el programa GCOS en la computadora y se creó un nuevo documento para cada muestra. Se ingresaron los códigos de barra de cada microarreglo ya sea por medio del scanner o tecleándolos y se apuntó que muestra corresponde en cada microarreglo.

En un tubo libre de nucleasas de 1.5ml se preparó la mezcla de hibridación maestra descrita en la Tabla V.

Tabla V. Preparación de la mezcla de hibridación maestra

Mezcla maestra de Marcaje	1 muestra
Solución de hibridación Affymetrix	94.7 μ L
B2 oligo 130X	1.3 μ L
Volumen total	96 μ L

Se le agregaron 96 μ L de la mezcla de hibridación maestra al tubo que contiene el producto marcado Multiplex PCR y se obtuvo el coctel de hibridación. Posteriormente, se colocaron los tubos en un termociclador Eppendorf Mastercycler y se usó el siguiente programa:

95°C – 5 minutos

49°C – 5 minutos

Se llenó el microarreglo RPM-FLU 3.1 con 120 μ L de la solución de pre-hibridación. Posteriormente, se colocó el microarreglo RPM-FLU 3.1 en el sujetador del horno de hibridación modelo 640 del sistema de Instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray y se rotó a 60 rpm por 10 minutos a 49°C. Después, se le removió la solución de pre-hibridación al microarreglo RPM-FLU 3.1 y se le adicionaron 120 μ L del coctel de hibridación. Se volvió a colocar en el sujetador del horno de hibridación modelo 640 del sistema de Instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray y se rotó a 60 rpm a 49°C por 16 horas.

Se prepararon 3 tubos de 1.5mL libres de nucleasas; uno transparente y dos ambar y se pusieron 500 μ L de solución Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) a un tubo ambar, 500 μ L de solución de Anticuerpos al tubo transparente y 800 μ l del buffer Array holding al segundo tubo ambar.

Se encendió la estación de fluidos modelo 450 del sistema de instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray y en el software GCOS, se seleccionó el módulo de la estación de lavado y se inició el prime, que consiste en cargar las mangueras del módulo

de la estación de fluidos con los buffers Wash A y Wash B. Se tomó el microarreglo RPM-FLU 3.1 del horno de hibridación y se removió el coctel de hibridación del microarreglo e inmediatamente después se le agregaron al microarreglo 120µL del buffer Array holding. Cuando el prime se completó, se seleccionó el protocolo Midi_DNAarray_WS5_450 en el software GCOS y se siguieron las instrucciones en la pantalla. Estas consisten en resumen en lo siguiente:

Se colocó el microarreglo RPM-FLU 3.1 en el sujetador de cartuchos horno de hibridación modelo 640 del sistema de Instrumentos de Affymetrix GeneChip Microarray y se seleccionó “run” del Menú de la estación de Fluidos. Mientras el microarreglo RPM-FLU 3.1 fue lavado, se encendió el escáner ya que tarda aproximadamente 15 minutos en estar listo. Se colocó el microarreglo en el escáner y se escaneó usando el software GCOS. Cuando el escaneado del microarreglo fue completado, se removió del escáner y se almacenó a 4°C. Posteriormente, se obtuvo un documento .CEL el cual contiene la imagen del microarreglo. Finalmente, se realizó un protocolo de shutdown en el módulo de la estación de fluidos el cual consiste en cambiar los frascos que contienen los buffers Wash A y Wash B por frascos que contienen agua destilada para así realizar el lavado de las mangueras. Una vez terminado el lavado se apagó el módulo.

10.9 Análisis e interpretación de resultados

El documento.CEL obtenido con la imagen escaneada del microarreglo se analizó en el software GSEQ 4.0 y se generó un documento .CHP que contiene tres marcos. El marco izquierdo contiene los nombres de las secuencias, el marco superior es una visualización gráfica de una secuencia y el marco inferior es la secuencia de la muestra.

Para la identificación de los patógenos presentes en la muestra, se exportaron las secuencias en formato “FASTA” y fue guardada en el disco duro. La secuencia guardada fue cargada al software de TessArae TESQ por medio de un portal de cliente en línea.

10.10 Análisis con TSEQ

Las secuencias fueron enviadas a la página de internet de la compañía TessArae <https://www.tessarae.com/username> y se envió el documento “FASTA”. Después de que el análisis TSEQ es completado, se recibió un correo electrónico con tres tipos de documentos por cada microarreglo enviado:

- 1) Documento “FASTA”; el cual contiene las secuencias de los patógenos encontrados.
- 2) La Figura 5 muestra el documento de reporte, que contiene los resultados de los controles, una vista general de las secuencias detectadas incluyendo nombre de la

secuencia, puntaje C3, Longitud de la secuencia más larga y continua y el tipo de patógeno.

3) Documento C3 con los resultados de los patógenos detectados.



Reporte HTML

Chip Name: UANL_SSA_SAMPLE11_130711			
Not Detected	Bordetella	Not Detected	Streptococcus
Not Detected	Bacillus	Not Detected	Staphylococcus
Not Detected	Chlamydia	Not Detected	Adenovirus
Not Detected	Corynebacterium	Not Detected	Coronavirus
Not Detected	Klebsiella	Not Detected	Cytomegalovirus
Not Detected	Yersinia	Detected	✓ Influenza
Not Detected	Francisella	Not Detected	Measles
Not Detected	Legionella	Not Detected	Metapneumovirus
Not Detected	Moraxella	Not Detected	Parainfluenza
Not Detected	Mycobacterium	Not Detected	RSV
Not Detected	Mycoplasma	Not Detected	Enterovirus
Not Detected	Neisseria	Not Detected	Variola
Not Detected	Haemophilus	Not Detected	Rubella
Not Detected	Pseudomonas	Pass	Amplification Control

Detalles del Chip:

Muestra: UANL_SSA_SAMPLE11_130711

Controles

PASS Control_A 98.34% of 482 bases (1 miscalled)
 PASS Control_B 98.88% of 446 bases (2 miscalled)
 PASS Control_C 95.76% of 495 bases (0 miscalled)
 PASS Control_D 97.15% of 456 bases (0 miscalled)

Secuencias Detectadas: 3

Name	C3 Score	LC Len	E-Value	Pathogen
FLUAM(H5N1)MATRIX		49.370	23	2e-50 Influenza
FLUAM(H1N1)	40.773	15	2e-24	Influenza
FLUAM(H3N2)	30.358	10	1e-22	Influenza

DESCRIPCIÓN	Len	Called	C3 Score	SNP	LC Len	GI	GenBank AC	E-Value
FLUAM(H1N1)	789	180	10.773	67	15	290048334		
CY055741.1		2e-24	122	Influenza A virus (A/Australia/43/2009(H1N1))				
segment 7, complete sequence								
FLUAM(H1N1)	789	180	10.773	67	15	294544608		
CY060521.1		2e-24	122	Influenza A virus				
(A/Ontario/222656/2009(H1N1)) segment 7 sequence								

Figura 5. Ventana ampliada de los resultados obtenidos en el reporte de TessArae. El reporte en HTML indica los patógenos detectados en rojo y los no detectados en azul. En los detalles del microarreglo se reportan los cuatro controles de amplificación, que corresponden a los tubos de Multiplex PCR A-D. El reporte también muestra la secuencia que hibridó en el microarreglo, el puntaje C3, el LC Len y el valor de expectativa, además de dar la descripción de la secuencia con la que presentó mayor similitud.

El software TSEQ evalúa el puntaje C3 para cada secuencia detectada, como una medida métrica de secuencia de DNA detectada en cantidad y calidad. El puntaje C3 es el número total de GSEQ-nucleótidos identificados que aparecen en corridas de tres o más pares de bases consecutivas, expresadas como el porcentaje de la longitud de cada secuencia detectada. Así mismo, también se obtienen el LC-Length el cual es la corrida más larga de nucleótidos identificada sin que haya presencia de una “n” y el valor de expectativa E (E-value) el cual es un parámetro que describe el número de hits que uno puede esperar encontrar por casualidad cuando se busca en una base de datos de un tamaño determinado. Este valor disminuye exponencialmente a medida que el puntaje C3 aumenta. Todas las secuencias detectadas son automáticamente sujetas a una búsqueda de alineamiento de bases en la base de datos de la compañía TessArae. Para que una secuencia sea reportada como positiva, las secuencias deberán tener un puntaje C3 mayor a 20, si el puntaje C3 se encuentra entre 10 y 20 se tiene que obtener un valor de expectativa E (E-value) menor a 1.0E-10 para que la muestra sea considerada como positiva.

10.11 Análisis Estadísticos

Una vez que se obtuvieron los resultados del análisis de las secuencias nucleotídicas, se realizaron los análisis de X^2 , binomiales, Φ^2 y de correlación entre los casos positivos para influenza AH1N1 pandémica por qPCR y los patógenos asociados a enfermedades respiratorias identificados por el microarreglo RPM-Flu 3.1. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS Statistics 17.0.

11. RESULTADOS

11.1 Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1

Para la estandarización y verificación del uso del microarreglo RPM-Flu 3.1 se procesaron las vacunas Fluzone® y Fluarix® las cuales contienen los tipos de virus de influenza AH1N1 estacional, AH3N2 y B, una muestra como control positivo para influenza AH1N1 pandémica por qPCR, la cual fue proporcionada por la Secretaria de Salud (SSA), y una muestra control con los tipos de influenza AH1N1 estacional, AH3N2 y Influenza B, además de las bacterias *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catharralis*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae* (proporcionada por la compañía TessArae).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en la vacuna FLUZONE® mostraron la presencia de altos porcentajes de similitud para influenza AH1N1 estacional (57.41%) así como para AH3N2 estacional (53.63%) y para influenza B (90.94%) como lo muestra la tabla VIa.

Estos resultados muestran que ésta vacuna contiene las cepas de los virus de influenza AH1N1 estacional, AH3N2 estacional e influenza B debido a que se lograron detectar las tres secuencias que codifican para las proteínas de matriz del virus de influenza A FLUAM (AH1N1), FLUAM (AH3N2) y para la proteína de matriz del virus de influenza B FLUBM. Los resultados mostraron los puntajes C3 para cada secuencia que hibridó en el microarreglo los cuales todos fueron mayores a 20 confirmando la positividad de estas tres secuencias en la muestra. Así mismo se obtuvieron los Lc-Len de cada secuencia identificada, para la FLUAM (AH1N1) su Lc-Len fue de 77, para la FLUAM (AH3N2) su Lc-Len fue de 56 y para la FLUBM (influenza B) su Lc-Len fue de 184. Las tres secuencias identificadas presentaron un valor de expectativa E de cero. Las secuencias que presentaron mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae con las secuencias encontradas en la muestra fueron A/X-113 (X-31B-Texas/36/1991)(H1N1)) segment 7, complete sequence, A/NYMC-X-157B (Puerto Rico/8/1934-New York/55/2004)(H3N2)) segment 7, complete sequence y B/Mississippi/UR06-0446/2007) segment 7, complete sequence.

Tabla VIa.- Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1 utilizando la vacuna FLUZONE®					
Tipo de Virus	Secuencia Identificada	Puntaje C3	Lc Len	Valor E	Secuencia Comparada

AH1N1 Estacional	FLUAM (AH1N1)	57.41	77	0	A/X-113(X-31B-Texas/36/1991)(H1N1)) segment 7, complete sequence
AH3N2	FLUAM (AH3N2)	53.63	56	0	A/NYMC X-157B(Puerto Rico/8/1934- New York/55/2004)(H3N2)) segment 7, complete sequence
B	FLUBM	90.95	184	0	B/Mississippi/UR06-0446/2007) segment 7, complete sequence

La vacuna FLUARIX® mostró la presencia de las secuencias nucleotídicas de influenza AH1N1 estacional (73.25%), AH3N2 estacional (74.10%) e influenza B (93.32%) como lo muestra la Tabla VIb. Estos resultados confirman que esta vacuna al igual que la FLUZONE® contiene las cepas de los virus de influenza AH1N1 estacional, AH3N2 estacion e influena B ya que se lograron detectar las secuencias que codifican para las proteínas de matriz FLUAM (AH1N1), FLUAM (AH3N2) del virus de influenza A y la secuencia que codifica para la proteína de Neuraminidasa FLUBNA-1 de la influenza B. Los puntajes C3 de las tres secuencias fueron mayores a 20 confirmando la positividad de estas secuencias en la muestra. Así mismo se obtuvieron los LC-Len de cada secuencia identificada, para la FLUAM (AH1N1) su Lc-Len fue de 81, para la FLUAM (AH3N2) su Lc-Len fue de 51 y para la FLUBNA-1 (influenza B) su Lc-Len fue de 124. Las tres secuencias identificadas presentaron un valor de expectativa E de cero. Las secuencias que presentaron mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae con las secuencias encontradas en la muestra fueron A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)) segment 7, complete sequence, A/Victoria/1968(H3N2)) segment 7, complete sequence y B/Brisbane/60/2008) segment 6 NB protein (NB) and neuraminidase (NA) genes, complete cds.

Tabla VIb.- Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1 utilizando la vacuna FLUARIX®					
Tipo de Virus	Secuencia Identificada	Puntaje C3	Lc Len	Valor E	Secuencia Comparada
AH1N1 Estacional	FLUAM (AH1N1)	73.25	81	0	A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)) segment 7, complete sequence
AH3N2	FLUAM (AH3N2)	74.10	51	0	A/Victoria/1968(H3N2)) segment 7, complete sequence

B	FLUBNA-1	95.32	124	0	B/Brisbane/60/2008) segment 6 NB protein (NB) and neuraminidase (NA) genes, complete cds
---	----------	-------	-----	---	--

De la misma manera, el control proporcionado por TessArae detectó, como se esperaba, las secuencias nucleotídicas de influenza estacionaria AH1N1 (73.63%), AH3N3 (72.50%), influenza B (88.94%), *Haemophilus influenzae* (86.30%), *Neisseria meningitidis* (56.83%), *Moraxella catharralis* (55.25%), *Mycoplasma* (28.60%) y *Streptococcus* (91.99%) simultáneamente como lo muestra la Tabla VIc.

Todos los puntajes C3 fueron mayores a 20 indicando la positividad de las secuencias en la muestra. Los LC-Len variaron desde 13 que fue el más pequeño hasta 134 que fue el mayor. Todos los valores de expectativa E fueron menores a 1e-10. Así mismo, la secuencia del control proporcionado por la SSA fue identificada como influenza AH1N1 pandémica ya que presentó un puntaje C3 de 45.03, LC- Len de 44 y un valor de expectativa E de 2e-152, además de presentar una mayor similitud con la secuencia A/New York/ 3235/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence (Tabla VIc).

Tabla VIc.- Estandarización del microarreglo RPM-Flu 3.1 utilizando controles positivos					
Patógeno	Secuencia Identificada	Puntaje C3	Lc Len	Valor E	Secuencia Comparada
AH1N1 Estacional	FLUAM (AH1N1)	73.63	90	0	A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)) segment 7, complete sequence
AH3N2	FLUAM (AH3N2)	72.50	50	0	A/Victoria/1968(H3N2)) segment 7, complete sequence
B	FLUBHA-1	88.94	134	0	B/Brisbane/60/2008) segment 6 NB protein (NB) and neuraminidase (NA) genes, complete cds
<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	86.30	98	2e-170	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
<i>Neisseria meningitides</i>	NEMEGYRA	56.83	32	1e-117	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58, complete genome

<i>Moraxella catharralis</i>	PSAEGYRA	55.25	23	4e-56	<i>Moraxella catharralis</i> DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MYPNGYRA	28.60	13	6e-81	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129, complete genome
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	91.99	62	4e-169	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
Influenza AH1N1 pandémica	FLUAM (AH1N1)	45.03	44	2e-52	A/New York/ 3235/2009(H1N1) segment 7, complete sequence

11.2.- Aislamiento de ácidos nucleicos de las muestras de influenza provenientes de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México

Un total de 233 muestras de influenza AH1N1 pandémica previamente analizadas por qPCR fueron proporcionadas por institutos de Salud de México. De las 233 muestras analizadas, 145 fueron proporcionadas por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste-IMSS Monterrey, Nuevo León (CIBNI) y 88 fueron proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud pública de Oaxaca, Oaxaca (LESPO). En la Tabla VII, se muestra que de las 145 muestras provenientes del CIBNI, 110 fueron positivas y 35 resultaron negativas para influenza AH1N1 pandémica cuando fueron analizadas mediante qPCR. Todas las muestras analizadas provenientes del LESPO fueron detectadas positivas para influenza AH1N1 pandémica por qPCR.

Tabla VII.- Casos positivos de influenza AH1N1 pandémica por PCR tiempo real	
CIBNI (9, 16, 17, 140-289)	
n= 145	
Positivos	110
Negativos	35
LESPO (35-114)	
n=88	
Positivos	88
Negativos	0

Se realizó la extracción de los ácidos nucleicos totales de las 233 muestras y se obtuvieron las concentraciones (ng/μL) y la calidad de los ácidos nucleicos mediante la determinación de la relación 260/280 del RNA utilizando el NanoDrop 2000c. La tabla VIII muestra 18 de los 233 casos analizados con el ID de la muestra y el estado de donde se obtuvo la muestra. Las concentraciones obtenidas de ácidos nucleicos totales las cuales varían desde 5.8 hasta 86.7 ng/μL y la relación 260/280 para cada muestra las cuales variaron desde 1.20 hasta 1.82.

Tabla VIII.- Concentración y calidad de los ácidos nucleicos totales		
ID muestra (Estado)	Concentración (ng/μL)	Relación 260/280
9 (Nuevo León)*	11.05	1.32
16 (Nuevo León)*	11.08	1.52
17 (Nuevo León)*	16.20	1.46
44 (Nuevo León)	58.5	1.54
47 (Nuevo León)	12.3	1.52
48 (Nuevo León)	15.8	1.48
129 (Nuevo León)	10.5	1.35
131 (Nuevo León)	8.5	1.61
133 (Nuevo León)	86.7	1.41
69 (Oaxaca)*	23.7	1.20
70 (Oaxaca)*	13.2	1.82
78 (Oaxaca)*	10.8	1.42
79 (Oaxaca)*	20.8	1.72
81 (Oaxaca) *	5.8	1.49
95 (Oaxaca)	7.3	1.36
102 (Oaxaca)	30.3	1.64
108 (Oaxaca)	8.9	1.47
114 (Oaxaca)*	13.5	1.28
<ul style="list-style-type: none"> • Muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica por el Microarreglo RPM-Flu 3.1 		

11.3.- Detección de diferentes tipos y subtipos del virus de la influenza

Todos los ácidos nucleicos obtenidos de las 233 muestras fueron procesados en el microarreglo RPM-Flu 3.1. Los resultados muestran que 70 fueron confirmadas para influenza AH1N1 pandémica (Tabla IXa), tres para influenza AH3N2 estacional (Tabla

IXb), tres para influenza B (Tabla IXc) y dos para influenza AH1N1 estacional (Tabla IXd) por el microarreglo RPM-Flu 3.1. Así mismo las 35 muestras negativas para influenza AH1N1 pandémica por qPCR también fueron confirmadas negativas con el microarreglo RPM-Flu 3.1.

Los resultados de las muestras positivas de influenza con el microarreglo RPM-Flu 3.1 se muestran en la Tabla Xa-d indicando el tipo de influenza encontrado en la muestra, la identificación de la muestra (ID muestra), la secuencia nucleotídica que codifica para el gen de interés con el cual se hibridó en el microarreglo (secuencia identificada), el puntaje C3 (C3 Score), el LC-Len, el valor de expectativa E (E-value), y la secuencia de la base de datos de TessArae que presenta la mayor similitud con la encontrada en la muestra (secuencia comparada).

La tabla IXa muestra la detección de los 70 casos positivos para influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1. Se muestra que el tipo de influenza encontrado en las 70 muestras fue influenza AH1N1 pandémica, las secuencias identificadas fueron la secuencia que codifica para el gen de matriz de la influenza AH1N1 pandémica (FLUAM) en 65 de las 70 muestras y la secuencia que codifica para el gen de la neuraminidasa de la influenza AH1N1 pandémica (FLUANA1) en 5 de las 75 muestras (69,259, 261, 274, 289), el puntaje C3 el cual en algunas muestra dio mayor a 20 indicando la presencia del virus mientras que en otras muestras el puntaje C3 dio entre 10 y 20 pero al observar el valor de expectativa E en todas fue menor de $1e-10$. Así mismo, también se obtuvieron los LC-Len de todas las muestras que varían desde 14 hasta 59, así como las secuencias que presentaron mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae que en su mayoría fue con las secuencias influenza A virus (A/Texas/JMS400/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence y influenza A virus (A/Berlin/INS361/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence.

ID	Influenza	Secuencia Identificada	Puntaje C3	LC Len	Valor E	Secuencia Comparada
9	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	19.3	23	2.00E-50	Influenza A virus (A/Texas/JMS400/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
16	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.4	14	5.00E-39	Influenza A virus (A/Berlin/INS361/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
17	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	16.8	23	6.00E-27	Influenza A virus (A/Beijing/741/2009(H1N1)) segment 7 sequence
35	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.3	24	6.00E-43	Influenza A virus (A/Texas/JMS365/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence

37	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	21.7	56	7.00E-94	Influenza A virus (A/swine/North Carolina/A01049173/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
39	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	22.6	58	8.00E-72	Influenza A virus (A/Berlin/INS361/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
52	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	14.4	32	4.00E-51	Influenza A virus (A/Texas/42173957/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
62	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	17	26	1.00E-57	Influenza A virus (A/Cologne/INS136/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
66	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	19.2	23	2.00E-57	Influenza A virus (A/Texas/42173957/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
69	Influenza AH1N1	FLUANA1(H1N1)	17.4	30	2.00E-76	Influenza A virus (A/Texas/45122538/2009(H1N1)) segment 6, complete sequence
70	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	47.9	59	6.00E-171	Influenza A virus (A/Athens/INS420/2010(H1N1)) segment 7, complete sequence
72	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	15.3	34	8.00E-32	Influenza A virus (A/Gangwon/1805/2009(H1N1)) segment 7 sequence
73	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	20	40	2.00E-38	Influenza A virus (A/Berlin/INS361/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
74	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	40	52	8.00E-145	Influenza A virus (A/Mexico City/005/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
78	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)	11.7	15	1.00E-26	Influenza A virus (A/New York/6257/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
79	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.6	32	1.00E-41	Influenza A virus (A/Texas/JMS365/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
81	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	32.8	58	1.00E-127	Influenza A virus (A/Bonn/INS284/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence

114	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	12.8	34	5.00E-47	Influenza A virus (A/Mexico/4646/2009(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1
140	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	28.5	39	1.00E-95	Influenza A virus (A/Cambodia/NHRCC00001/2009(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
141	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	35.1	38	2.00E-128	Influenza A virus (A/Cambodia/NHRCC00001/2009(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
145	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	12.2	29	1.00E-37	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
180	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	15.7	23	4.00E-40	Influenza A virus (A/Denmark/28/2011(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, partial cds
188	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.6	39	5.00E-44	Influenza A virus (A/Czech Republic/1/2011(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) gene, partial cds; and matrix protein 1 (M1) gene, complete cds
195	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	30.1	58	8.00E-110	Influenza A virus (A/Athens/INS122/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
196	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.1	25	6.00E-40	Influenza A virus (A/Czech Republic/1/2011(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) gene, partial cds; and matrix protein 1 (M1) gene, complete cds
197	Influenza	FLUAM(H1N1)MATRIX	12.1	18	1.00E-32	Influenza A virus (A/swine/England/17394/96
200	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	24	38	7.00E-87	Influenza A virus (A/Cambodia/NHRCC00005/2009(H1N1)) matrix protein
202	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	32.4	58	1.00E-118	Influenza A virus (A/Athens/INS122/2009(H1N1)) segment 7

203	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIZ	12.9	33	2.00E-44	Influenza A virus (A/Cambodia/NHRCC00001/2009(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
204	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	14.6	40	2.00E-44	Influenza A virus (A/Texas/JMS365/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
205	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	14.2	57	1.00E-46	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
206	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.5	27	7.00E-39	Influenza A virus (A/Warsaw/INS99/2009(mixed)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
207	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	10.5	21	8.00E-28	Influenza A virus (A/New York/4761/2009(H1N1)) segment 7
208	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	10.8	23	6.00E-33	Influenza A virus (A/Aalborg/INS283/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
211	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	11.3	29	2.00E-27	Influenza A virus (A/duck/Guangxi/380/2004(H5N1)) matrix (M) gene, complete cds
213	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	31.1	58	6.00E-120	Influenza A virus (A/Athens/INS122/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
214	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	56.7	63	0	Influenza A virus (A/Denmark/118/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, partial cds
217	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	19.4	56	2.00E-61	Influenza A virus (A/Athens/INS122/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
224	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	17.5	56	9.00E-52	Influenza A virus (A/Cologne/INS136/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence

225	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	11	20	4.00E-29	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
226	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	17.6	56	4.00E-56	Influenza A virus (A/New York/4761/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
228	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	34.1	58	2.00E-123	Influenza A virus (A/Cambodia/NHRCC00008/2009(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
229	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	18.8	58	3.00E-60	Influenza A virus (A/Czech Republic/1/2011(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) gene, partial cds; and matrix protein 1 (M1) gene, complete cds
230	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	27.3	57	2.00E-99	Influenza A virus (A/Cologne/INS136/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
231	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	28.3	59	1.00E-113	Influenza A virus (A/Cambodia/NHRCC00005/2009(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
233	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	14.5	38	3.00E-45	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
234	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)	14.7	34	1.00E-49	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7
237	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.3	45	1.00E-37	Influenza A virus (A/Warsaw/INS99/2009(mixed)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 M1
239	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	14.7	43	6.00E-51	Influenza A virus (A/Cologne/INS136/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence

240	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	15.3	57	3.00E-56	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
243	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	19.7	56	2.00E-70	Influenza A virus (A/Catalonia/S2068/2009(H1N1)) segment 7 sequence
249	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	37.5	55	1.00E-129	Influenza A virus (A/Ulaanbaatar/190/2011(H1N1)) neuraminidase (NA) gene, complete cds
250	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	23.3	58	3.00E-85	Influenza A virus (A/Texas/JMS365/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
252	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	39.1	41	9.00E-140	Influenza A virus (A/Boston/635/2009(H1N1)) nuclear export protein (NEP) and nonstructural protein 1 (NS1) genes, complete cds
253	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	17.3	29	2.00E-42	Influenza A virus (A/Texas/JMS365/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
259	Influenza AH1N1	FLUANA1(H1N1)	14.8	28	2.00E-71	Influenza A virus (A/New York/4761/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
260	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	26.9	58	6.00E-94	Influenza A virus (A/California/VRDL48/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
261	Influenza AH1N1	FLUANA1(H1N1)	13.3	29	7.00E-40	Influenza A virus (A/Managua/4063.01/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
262	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	35.9	56	6.00E-131	Influenza A virus (A/Warsaw/INS315/2009(H1N1)) segment 8, complete sequence
264	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	26.3	39	2.00E-100	Influenza A virus (A/New York/4761/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
269	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	19.4	52	3.00E-70	Influenza A virus (A/Managua/4063.01/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
271	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	13.9	23	1.00E-49	Influenza A virus (A/British Columbia/GFA0401/2009(H1N1)) segment 7 sequence

273	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	17.4	56	5.00E-58	Influenza A virus (A/Athens/INS329/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
274	Influenza AH1N1	FLUANA1(H1N1)	12.6	27	2.00E-71	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
276	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	18.6	56	3.00E-71	Influenza A virus (A/Wisconsin/629-D01140/2009(H1N1)) segment 8, complete sequence
279	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	26	57	2.00E-86	Influenza A virus (A/British Columbia/GFA0401/2009(H1N1)) segment 7 sequence
282	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	16.8	25	1.00E-57	Influenza A virus (A/swine/Nebraska/A01049048/2010(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds
283	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	11.7	54	3.00E-34	Influenza A virus (A/New York/3225/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
284	Influenza AH1N1	FLUAM(H1N1)MATRIX	21.1	38	2.00E-74	Influenza A virus (A/Athens/INS329/2009(H1N1)) segment 7, complete sequence
289	Influenza AH1N1	FLUANA1(H1N1)	13.8	30	2.00E-72	Influenza A virus (A/Czech Republic/1/2011(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) gene, partial cds; and matrix protein 1 (M1) gene, complete cds

La tabla IXb muestra la detección de los tres casos positivos para influenza AH3N2 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1. También muestra que en los tres casos el tipo de influenza encontrado fue AH3N2, la secuencia con la que hibridó la muestra 179 fue con la secuencia que codifica para el gen de matriz de la influenza AH3N2 (FLUAM), su puntaje C3 fue de 97.5, su LC-Len fue de 349 y presentó un valor de expectativa E de cero. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza A virus (A/Beijing-Xuanwu/132/2006(H3N2)) segment 7 sequence. La secuencia con la que hibridó la muestra 219 fue con la secuencia que codifica para el gen de matriz de la influenza AH3N2 (FLUAM), su puntaje C3 fue de 14.4, su LC-Len fue de 24 y su valor de expectativa E fue de 6e-38. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza A virus (A/Beijing-Xuanwu/132/2006(H3N2)) segment 7 sequence. La

secuencia con la que hibridó la muestra 251 fue con la secuencia que codifica para el gen de neuraminidasa de la influenza AH3N2 (FLUANA2), su puntaje C3 fue de 81.1, su LC-Len fue de 131 y su valor de expectativa E fue cero. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza A virus (A/Texas/NHRC0001/2011(H3N2)) neuraminidase (NA) gene.

Tabla IXb.- Muestras positivas de Influenza AH3N2 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1						
ID muestra	Tipo de Influenza	Secuencia Identificada	Puntaje C3	LC Len	Valor E	Secuencia Comparada
179	Influenza AH3N2	FLUAM(H3N2)	97.5	349	0	Influenza A virus (A/Beijing-Xuanwu/132/2006(H3N2)) segment 7 sequence
219	Influenza AH3N2	FLUAM(H3N2)	14.4	24	6e-38	Influenza A virus (A/Beijing-Xuanwu/132/2006(H3N2)) segment 7 sequence
251	Influenza H3N2	FLUANA2	81.1	131	0	Influenza A virus (A/Texas/NHRC0001/2011(H3N2)) neuraminidase (NA) gene

De la misma manera la tabla IXc muestra la detección de los tres casos positivos para influenza B estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1. Se muestra que en los tres casos el tipo de influenza encontrado fue la influenza B, la secuencia con la que hibridó la muestra 184 fue con la secuencia que codifica para el gen de hemaglutinina de la influenza B (FLUBHA-1), su puntaje C3 fue de 10.2, su LC-Len fue de 34 y su valor de expectativa E fue 2e-27. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza B virus (B/North Carolina/WRAIR1582P/2009) segment 7 sequence. La secuencia con la que hibridó la muestra 185 fue con la secuencia que codifica para el gen de matriz de la influenza B (FLUBM), su puntaje C3 fue de 10.9, su LC-Len fue de 25 y su valor de expectativa E fue 9e-35. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza B virus (B/North Carolina/WRAIR1582P/2009) segment 7 sequence. La secuencia con la que hibridó la muestra 202 fue con la secuencia que codifica para el gen de hemaglutinina de la influenza B (FLUBHA-1), su puntaje C3 fue de 11.06, su LC-Len fue de 49 y su valor de expectativa E fue 2e-34. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza B virus (B/Mississippi/UR06-0340/2007) segment 4, complete sequence.

Tabla IXc.- Muestras positivas de Influenza B estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1						
ID muestra	Tipo de Influenza	Secuencia Identificada	Puntaje C3	LC Len	Valor E	Secuencia Comparada
184	Influenza B	FLUBHA-1	10.2	34	2.00E-27	Influenza B virus (B/North Carolina/WRAIR1582P/2009) segment 7 sequence
185	Influenza B	FLUBM	10.9	25	9.00E-35	Influenza B virus (B/North Carolina/WRAIR1582P/2009) segment 7 sequence
202	Influenza B	FLUBHA-1	11.06	49	2e-34	Influenza B virus (B/Mississippi/UR06-0340/2007) segment 4, complete sequence

La tabla IXd muestra la detección de los dos casos positivos para influenza AH1N1 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1 Se muestra que en los dos casos el tipo de influenza encontrado fue la influenza AH1N1 estacional, la secuencia con la que hibridó la muestra 218 fue con la secuencia que codifica para el gen de matriz de la influenza AH1N1 estacional (FLUAM), su puntaje C3 fue de 12.2, su LC-Len fue de 41 y su valor de expectativa E fue 2e-35. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza A Virus (A/swine/Brno/1/1992(H1N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) gene, partial cds; and matrix protein 1 (M1) gene, complete cds. La secuencia con la que hibridó la muestra 227 fue con la que codifica para el gen de matriz de la influenza AH1N1 estacional (FLUAM), su puntaje C3 fue de 11.6, su LC-Len fue de 23 y su valor de expectativa E fue 3e-32. La secuencia que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue influenza A virus (A/swine/France/WVL13/1995(H1N1)) segment 7 sequence.

Tabla IXd.- Muestras positivas de Influenza AH1N1 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1						
ID muestra	Tipo de Influenza	Secuencia Identificada	Puntaje C3	LC Len	E-value	Secuencia Comparada

218	Influenza AH1N1E	FLUAM(H1 N1)MATRI X	12.2	41	2.00E-35	Influenza A Virus (A/swine/Brno/1/1992(H1 N1)) segment 7 matrix protein 2 (M2) gene
227	Influenza AH1N1E	FLUAM(H1 N1)MATRI X	11.6	23	3.00E-32	Influenza A virus (A/swine/France/WVL13/1995(H1N1)) segment 7 sequence

11.4.- Detección de la infección y/o co-infección de patógenos asociados a influenza.

Por medio del análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en el microarreglo RPM-Flu 3.1 se detectaron los patógenos asociados a enfermedades respiratorias en las 233 muestras analizadas. La tabla Xa muestra que de las 70 muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-FLU 3.1, 48 presentaron co-infecciones con otros patógenos asociados a enfermedades respiratorias. Se encontró la presencia del género *Streptococcus* en 31 casos, *Pseudomonas* en 23 casos, *Haemophilus* en 18 casos, *Neisseria* en 9 casos y *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Coronavirus*, *Coxsackie* en un caso. Se obtuvo el puntaje C3 el cual en la mayoría de las muestras dio mayor a 20 indicando la presencia del patógeno mientras que en otras muestras el puntaje C3 dio entre 10 y 20 pero al observar el valor de expectativa E en todas fue menor de 1e-10. Así mismo también se obtuvieron los LC-Len de todas las muestras que varían desde 10 hasta 275. Todos los valores de expectativa E fueron menores a 1e-10 lo cual corrobora la presencia de las secuencias nucleotídicas de las bacterias encontradas.

Tabla Xa.- Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1

ID	Patógenos asociados	Secuencia Identificada	Puntaje C3	LC Len	Valor E	Secuencia Comparada
16	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	41.5	53	5.00E-68	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 3180 DNA gyrase A subunit gene, complete
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	31.74	25	3.00E-65	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047

17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	35.0	19	3.00E-27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14
37	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	91.1	135	4e-176	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	25.72	24	1e-47	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	21.2	31	5e-37	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
39	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	19.4	12	1.00E-47	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	26.1	23	3.00E-50	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	74.3	34	2.00E-75	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
62	<i>Pseudomonas mendocina</i>	PSAEGYRA	36.1	28	1.00E-26	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp, complete genome
	<i>Streptococcus pneumonie</i>	STPNLYTP	87.3	112	2.00E-173	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17

66	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	43.4	62	2.00E-72	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	29.1	20	6.00E-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome
	<i>Coxsackievirus</i>	EV20UTR	33.9	38	5.00E-78	<i>Coxsackievirus B3</i> strain 31-1-93, complete genome
69	<i>Pseudomonas putida</i>	PSAEGYRA	37.5	28	1.00E-28	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome
72	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	96	259	0	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	20	22	9.00E-24	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047 genome
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	70	27	5.00E-66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
73	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	97.6	275	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2254 pneumolysin (ply) gene
74	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	65.1	45	4.00E-137	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene

	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	27.8	33	7.00E-47	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	24.6	20	5.00E-45	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha710, complete genome
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	23.3	16	6.00E-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence
78	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	31.3	27	2.00E-79	<i>Streptococcus mitis</i> strain 990123 mitilysin gene, complete cds
79	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	91.1	140	2.00E-180	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	87.7	120	7.00E-166	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	19.9	36	2.00E-42	<i>Neisseria meningitidis</i> M04-240196, complete genome
81	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	27.5	20	1.00E-59	<i>Neisseria meningitidis</i> M04-240196, complete genome
114	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	31.0	12	9.00E-74	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin
140	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	97.4	182	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2254 pneumolysin (ply) gene, ply-2

	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	86.7	87	3.00E-166	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	77.1	57	9.00E-155	<i>Neisseria meningitidis</i> 053442, complete genome
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	PSAEGYRA	43.9	29	8.00E-38	<i>Moraxella catarrhalis</i> DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds
141	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	88.8	113	2.00E-177	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2254 pneumolysin (ply) gene, ply-2 allele
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	56.6	34	6.00E-111	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	26.9	23	1.00E-43	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha14 complete genome
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	20.6	12	6.00E-19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
145	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	16.8	12	2.00E-29	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha710, complete genome
	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNGYRA	52.3	19	1.00E-109	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds

	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	28.1	22	1.00E-43	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	25.6	18	4.00E-19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence
180	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	33.6	81	3.00E-62	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome
195	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	16.8	28	5.00E-35	<i>Streptococcus mitis</i> strain R77 mitilysin gene, complete cds
202	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	10.9	10	5.00E-23	<i>Streptococcus pneumoniae</i> CGSP14, complete genome
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	48.9	60	1.00E-93	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome
203	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	78.6	90	2.00E-165	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	35.7	27	7.00E-29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
205	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	26.6	26	1.00E-61	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4, complete genome

	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	13.9	12	2.00E-20	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
208	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	28	18	6.00E-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	71.2	61	8.00E-146	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
217	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	54	35	3.00E-48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14
224	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	29.7	30	1.00E-46	<i>Haemophilus influenzae</i> F3031 genome
225	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	73.5	58	4.00E-151	<i>Streptococcus mitis</i> strain R77 mitilysin gene, complete cds
226	<i>Coronavirus</i>	HCVNL63M P	14.7	91	8.00E-29	Human group 1 <i>Coronavirus</i> associated with pneumonia, complete genome
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	89	62	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> partial lytA gene
230	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNGYRA	37	25	7.00E-68	<i>Streptococcus mitis</i> B6 complete genome, strain B6

231	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	40.5	30	6.00E-87	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
233	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	23	35	1.00E-42	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	15.3	16	3.00E-21	<i>Neisseria meningitidis</i> NZ-05/33, complete genome
237	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	25.3	20	6.00E-44	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	21.1	34	4.00E-42	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha14 complete genome
243	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	31.1	21	1.00E-26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence
250	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	98.1	174	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2338 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds
252	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUMEC A	58.7	40	4.00E-124	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain
253	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	22.9	30	3.00E-15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome

259	<i>Pseudomonas putida</i>	PSAEGYRA	40.4	32	9.00E-38	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome
260	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	16.3	25	1.00E-26	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4, complete genome
	<i>Pseudomonas syringae</i>	PSAEGYRA	33.4	30	3.00E-27	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000, complete genome
261	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	80.6	74	2.00E-163	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	45.6	50	1.00E-103	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
262	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	86.3	130	2.00E-176	<i>Streptococcus mitis</i> B6 complete genome
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	31.9	24	1.00E-24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain WUXIPA06 DNA gyrase (gyrA) gene, partial cds
264	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	83.1	122	5.00E-167	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
269	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PSAEGYRA	46.6	82	2.00E-44	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 complete genome
271	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	24.6	13	7.00E-52	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene,

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	36.1	36	4.00E-28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain WUXIPA06 DNA gyrase (gyrA) gene, partial cds
273	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	22.4	24	2.00E-38	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 670-6B, complete genome
279	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	22.6	48	1.00E-38	<i>Streptococcus pneumoniae</i> partial lytA gene for autolysin, strain 670
282	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	42.2	21	1.00E-96	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
	<i>Pseudomonas syringae</i>	PSAEGYRA	29.5	43	1.00E-21	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000, complete genome
283	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	31.1	77	2.00E-23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain
284	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	34.2	65	4.00E-27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain WUXIPA19 DNA gyrase (gyrA) gene, partial cds
289	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	21.9	23	2.00E-37	<i>Streptococcus pneumoniae</i> partial lytA gene for autolysin, strain VA1
	<i>Pseudomonas syringae</i>	PSAEGYRA	21.7	19	1.00E-17	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000

La tabla Xb muestra los patógenos asociados a enfermedades respiratorias que presentaron co-infección con influenza AH1N1 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1. De los dos casos positivos para influenza AH1N1 estacional solo una muestra presentó co-infección y esta fue con la bacteria *Haemophilus influenzae*. La secuencia con la que hibridó fue HAINOMPP5, el puntaje C3 fue 17.62, su LC-Len fue 23 y su valor expectativa E fue de 1e-24, lo cual corrobora la secuencia nucleotídica del genoma de *H. influenzae* encontrada en la base de datos de la compañía TessArae.

Tabla Xb.- Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza AH1N1 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1						
ID muestra	Patógeno Asociado	Secuencia Identificada	Puntaje C3	LC Len	Valor E	Secuencia Comparada
227	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP 5	17.61	23	1e-24	<i>Haemophilus influenzae</i> PittGG, complete genome

La tabla Xc muestra los patógenos asociados a enfermedades respiratorias que presentaron co- infección con influenza AH3N2 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1. La muestra 179 presentó co-infección con la bacteria *Staphylococcus aureus*, la secuencia con la que hibridó fue STAUMECA, su puntaje C3 fue 11.23, su LC-Len fue de 28 y su valor de expectativa E fue de 2e-25. La secuencia con la que presento mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue *Staphylococcus aureus* strain cm47 SCCmec type IVA element, partial sequence. La muestra 219 presentó co-infección con la bacteria *Haemophilus influenzae*, la secuencia con la que hibridó fue HAINOMPP5, su puntaje C3 fue 22.26, su LC-Len fue de 37 y su valor de expectativa E fue de 1e-27. La secuencia con la que presentó mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue *Haemophilus influenzae* 10810 genome. La muestra 251 presentó co-infección con las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Moraxella catharralis*, Las secuencias identificadas fueron MOCACOPB para *Moraxella catharralis* con un puntaje C3 de 18.69, LC-Len de 20 y un valor de expectativa E de 2e-40, la secuencia PSAEGYRA para *Pseudomonas aeruginosa* con un puntaje C3 de 44.74, LC-Len de 26 y un valor de expectativa E de 1e-48 y la secuencia STAUGYRA para *Staphylococcus aureus* con un puntaje C3 de 70.16, LC-Len de 71 y un valor de expectativa E de 1e-143.

Tabla Xc.- Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza AH3N2 estacional con el microarreglo RPM-Flu 3.1						
ID muestra	Patógeno Asociado	Secuencia Identificada	Punta jeC3	LC Len	Valor E	Secuencia Comparada

179	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUMECA	11.23	28	2e-25	<i>Staphylococcus aureus</i> strain cm47 SCCmec type IVA element, partial sequence
219	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	22.26	37	1e-27	<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 genome
251	<i>Moraxella catharralis</i>	MOCACOPB	18.69	20	2e-40	<i>Moraxella catharralis</i> strain O12E outer membrane protein CopB gene, complete cds
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	44.74	26	1e-48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain WUXIPA19 DNA gyrase (gyrA) gene, partial cds
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUGYRA	70.16	71	1e-143	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain MRSA252, complete genome

La tabla Xd muestra los patógenos asociados a enfermedades respiratorias que presentaron co- infección con influenza B con el microarreglo RPM-Flu 3.1. De los tres casos positivos para influenza B, dos presentaron co-infecciones y estas fueron con *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Rinovirus*. La muestra 184 presentó co-infección con el virus *Rinovirus*, la secuencia con la que hibrido fue HRV85UTR, su puntaje C3 fue 25.58, su LC-Len fue de 20 y su valor de expectativa E fue de 4e-43. La secuencia con la que presento mayor similitud de la base de datos de la compañía TessArae fue *Human rinovirus* 9 isolate F02, complete genome. La muestra 202 presentó co-infección con las bacterias *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Las secuencias identificadas fueron HAINGYRA para *Haemophilus influenzae* con un puntaje C3 de 48.96, LC-Len de 60 y un valor de expectativa E de 1e-93, la secuencia STPNLYTP para *Streptococcus pneumoniae* con un puntaje C3 de 10.92, LC-Len de 10 y un valor de expectativa E de 5e-23.

Tabla Xd.- Patógenos asociados a muestras positivas de Influenza B con el microarreglo RPM-Flu 3.1						
ID muestra	Patógeno Asociado	Secuencia Identificada	Puntaje C3	LC Len	Valor E	Secuencia Comparada

184	<i>Rinovirus</i>	HRV85UTR	25.58	20	4e-43	<i>Human rhinovirus 9</i> isolate F02, complete genome
202	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	48.96	60	1e-93	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	10.92	10	5e-23	<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39, complete genome

Por otro lado, los patógenos asociados a enfermedades respiratorias identificados con el microarreglo RPM-flu 3.1 se analizaron por Institución. En resumen los patógenos encontrados en las muestras analizadas fueron del género *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Klebsiella*, *Rinovirus*, *Coronavirus*, *Parainfluenza* y *Coxsackie* como se resume en la Tabla XI. De las 145 muestras del estado de Nuevo León los patógenos encontrados correspondieron al género *Streptococcus* en 49 casos, *Haemophilus* en 29 casos, *Neisseria* en 13 casos, *Pseudomonas* en 38 casos, *Staphylococcus* en siete casos, *Moraxella* en seis casos, *Rinovirus* en seis casos, *Coronavirus* en dos casos y *Parainfluenza* en dos casos. De las 88 muestras del estado de Oaxaca los patógenos encontrados correspondieron al género *Streptococcus* en 43 casos, *Haemophilus* en 37 casos, *Neisseria* en 24 casos, *Pseudomonas* en 22 casos, *Staphylococcus* en cinco casos, *Moraxella* en un caso, *Klebsiella* en un caso y *Coxsackie* en dos casos.

Tabla XI.- Total de patógenos asociados a enfermedades respiratorias confirmadas con el microarreglo RPM-Flu 3.1 en los Estados de Nuevo León y Oaxaca, México															
Nuevo León (N=145)															
	AH1N1 pandémica	H1N1 Estacional	H3N2 estacional	Influenza B	<i>Streptococcus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Rinovirus</i>	<i>Coronavirus</i>	<i>Parainfluenza</i>	<i>Coxsackie</i>
+	55	2	3	3	49	29	13	38	7	6	0	6	2	2	0

Oaxaca (N=88)															
+	15	0	0	0	43	37	24	22	5	1	1	0	0	0	2

De las 233 muestras analizadas, 14 fueron negativas para influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1 y por qPCR y también fueron negativas para la detección de los patógenos con el microarreglo RPM-Flu 3.1. De las 219 muestras restantes:

44 fueron positivas para influenza AH1N1 pandémica por qPCR pero negativas para influenza AH1N1 pandémica y los patógenos con el microarreglo RPM-Flu 3.1, 70 positivas para influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1 de las cuales 48 presentaron co-infecciones con otros patógenos (Tabla IXa y Xa), 84 fueron negativas para influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1 pero que fueron positivas para influenza AH1N1 pandémica por qPCR y positivas para cualquier otro patógeno con el microarreglo RPM-Flu 3.1 (Apendice A), y 21 que fueron negativas para influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1 y por qPCR pero positivas para los patógeno con el microarreglo RPM-Flu 3.1 (Apendice A).

Adicionalmente, se realizó un análisis de asociación entre los patógenos encontrados con el microarreglo RPM-Flu 3.1 tomando en cuenta las 233 muestras. En el caso de influenza AH1N1 pandémica se tomaron los casos positivos para qPCR (198). La tabla XII muestra los patógenos identificados y su porcentaje del total de las muestras (233). Se observa que los patógenos que presentaron mayor frecuencia fueron influenza AH1N1 pandémica (85.34%), *Streptococcus* (39%), *Haemophilus* (28%), *Pseudomonas* (25%), *Neisseria* (15%) y *Staphylococcus* (5%). La tabla muestra también las infecciones simples y co-infecciones que presentó cada patógeno con respecto a sus casos positivos. Se observa que los patógenos que presentaron el mayor número de co-infecciones fueron influenza AH1N1 2009, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Neisseria* y *Staphylococcus*. Adicionalmente, se muestra la asociación de todos los patógenos encontrados con el microarreglo RPM-Flu 3.1.

Tabla XII.- Asociación entre los patógenos (bacterias y virus) encontrados con Influenza AH1N1 pandémica

N =	AH1N1 2009	AH3N2 E	AH1N1 E	Influenza B	<i>Streptococcus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Rinovirus</i>	<i>Coronavirus</i>	<i>Parainfluenza</i>	<i>Coxsackie</i>	<i>Klebsiella</i>
233	198	3	2	3	92	66	60	37	12	7	6	2	2	2	1
Positivas *	(85%)	(1)	(0.8)	(1)	(39)	(28)	(25)	(15)	(5)	(3)	(2)	(0.8)	(0.8)	(0.8)	(0.4)
Infecciones	69	0	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Simples	(34%)				(2)	(1)	(3)						(100)		

Co-infecciones	129	3	2	3	90	65	58	37	12	7	6	2	0	2	1
**	(65%)	(1)	(100)	(100)	(97)	(98)	(96)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	0	(100)	(100)
AH1N1 2009	-	1	2	3	81	59	52	36	9	5	2	1	0	2	1
		(33)	(100)	(100)	(88)	(89)	(86)	(97)	(75)	(71)	(33)	(50)	0	(100)	(100)
AH3N2 Estacional	1 (0.5%)	-	0	0	0	1 (1)	1 (1)	0	2 (16)	1 (14)	0	0	0	0	0
AH1N1 estacional	2 (1%)	0	-	0	0 (0)	1 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Influenza B	3 (1.5)	0	0	-	1 (1)	1 (1)	0	0	0	0	1 (16)	0	0	0	0
Streptococcus	81 (40)	0	0	1 (33)	-	50 (75)	24 (40)	30 (81)	3 (25)	4 (57)	3 (50)	1 (50)	0	1 (50)	1 (100)
Haemophilus	59 (29)	1 (33)	1 (50)	1 (33)	50 (54)	-	19 (31)	31 (83)	2 (16)	3 (42)	2 (33)	0	0	1 (50)	1 (100)
Pseudomonas	52 (26)	1 (33)	0	0	24 (26)	19 (28)	-	9 (24)	4 (33)	2 (28)	2 (33)	1 (50)	0	2 (100)	0
Neisseria	36 (18)	0	0	0	30 (32)	31 (46)	9 (15)	-	0	3 (42)	2 (33)	0	0	0	1 (100)
Staphylococcus	9 (4)	2 (66)	0	0	3 (3)	2 (3)	4 (6)	0	-	1 (14)	0	0	0	0	0
Moraxella	5 (2)	1 (33)	0	0	4 (4)	3 (4)	2 (3)	3 (8)	1 (8)	-	1 (16)	0	0	0	0
Rinovirus	2 (1)	0	0	1 (33)	3 (3)	2 (3)	2 (3)	2 (5)	0	1 (14)	-	0	0	0	0
Coronavirus	1 (0.5)	0	0	0	1 (1)	0	1 (1)	0	0	0	0	-	0	0	0
Parainfluenza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
Coxackie	2 (1)	0	0	0	1 (1)	1 (1)	2 (3)	0	0	0	0	0	0	-	0
Klebsiella	1 (0.5)	0	0	0	1 (1)	1 (1)	0	1 (2)	0	0	0	0	0	0	-

*El número entre paréntesis representa el porcentaje en las 233 muestras

** Dos o mas patógenos presentes en una muestra.

Para analizar la distribución y asociación de los patógenos con el virus de la influenza se realizaron los análisis estadísticos χ^2 , binomial, Φ^2 y correlación de Pearson como lo muestra la tabla XIII. Se observa la distribución de todos los patógenos encontrados con el microarreglo RPM-FLu 3.1 en las 233 muestras con los casos positivos y negativos de influenza AH1N1 2009 por qPCR. Los generos de patógenos que presentaron mayor porcentaje de asociación con la prueba Phi con los casos positivos de influenza AH1N1 pandémica fueron *Streptococcus* (40.4%), *Haemophilus* (36.4%), *Pseudomonas* (34%) y *Neisseria* (35%). Sorprendentemente, el género *Neisseria* mostró una correlación positiva con el virus de influenza AH1N1 pandémica (0.105) con la correlación de Pearson mientras que los géneros *Moraxella*, *Rinovirus* y *Parainfluenza* mostraron una correlación negativa de -0.135, -0.325 y -0.295 respectivamente.

Tabla XIII.- Distribución de los patógenos positivos con el microarreglo RPM-FLu 3.1 en los casos positivos y negativos de Influenza AH1N1 pandémica por qPCR							
Patógeno	Total n	AH1N1 2009 +	AH1N1 2009 -	χ^2 o binomial	Φ^2	% Asociación	Correlación Pearson
AH3N2	3	1(0.51)	2(9.52)	1	0.911	8.9	-
AH1N1 Estacional	2	2(1.01)	0(0)	0.5	0.704	29.6	-
Influenza B	3	3(1.52)	0(0)	0.25	0.702	29.8	-
<i>Streptococcus</i>	92	81(40.91)	11(52.38)	0	0.596	40.4	-
<i>Haemophilus</i>	66	59(29.8)	7(33.33)	0	0.636	36.4	-
<i>Pseudomonas</i>	60	52(26.26)	8(38.1)	0	0.66	34	-
<i>Nesseria</i>	37	36(18.18)	1(4.76)	0	0.65	35	0.105
<i>Staphylococcus</i>	12	9(4.55)	3(14.29)	0.083	0.776	22.4	-
<i>Moraxella</i>	7	5(2.53)	2(9.52)	0.688	0.810	19	- 0.135
<i>Rinovirus</i>	6	2(1.01)	4(19.05)	0.688	0.910	9	- 0.325
<i>Coronavirus</i>	2	1(0.51)	1(4.76)	1	0.865	13.5	-
<i>Parainfluenza</i>	2	0(0)	2(9.52)	0.5	1	0	- 295
<i>Coxackie</i>	2	2(1.01)	0(0)	0.5	0.704	29.6	-

<i>Klebsiella</i>	1	1(0.51)	0(0)	-	0.705	29.5	-
<i>Co-infecciones</i>		129(65.15)	13(61.9)				
<i>Infecciones simples</i>		69(34.85)	8(38.1)				
Muestras positivas		198	21				
Número total de muestras		198	35				

12. DISCUSIÓN

El virus de influenza causa un gran número de enfermedades y muertes, y tiene un serio impacto social y económico en todo el mundo. Cada año, el virus de influenza A causa de tres a cinco millones de infecciones graves en humanos y 0.25-0.5 millones de personas mueren por gripe en todo el mundo. Los principales factores que hacen tan peligroso al virus de la influenza A son su elevada tasa de mutación generando epidemias de influenza anuales, y la redistribución de los segmentos en la co-infección de diferentes virus de influenza A en una misma célula, lo que conduce a una nueva cepa capaz de ocasionar una pandemia. Es por esto que en esta investigación establecimos un programa de vigilancia epidemiológico capaz de detectar los tipos y subtipos del virus de influenza en la población de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México.

Para determinar el tipo de virus y patógenos asociados, se seleccionó la plataforma de microarreglos RPM-Flu 3.1 que demostró ser capaz de identificar los diferentes tipos y subtipos del virus de influenza de una forma rápida, simultánea, y eficaz.

Primeramente se llevó acabo la validación del microarreglo RPM-Flu 3.1 aislando los ácidos nucleicos de las muestras e identificando las secuencias presentes en vacunas como Fluzone, Fluarix y controles positivos proporcionados por la SSA del Estado de Nuevo León, así como una muestra positiva proporcionada por la compañía TessArae.

Se observó que secuencias específicas de cada subtipo del virus de influenza A y secuencias nucleotídicas específicas del virus de influenza B hibridaron a su complementaria en el microarreglo RPM-Flu 3.1, permitiendo la correcta identificación del tipo y subtipo del virus de influenza. Las secuencias nucleotídicas obtenidas en la vacuna FLUZONE mostraron la presencia de altos porcentajes de similitud por medio del puntaje C3 para influenza AH1N1 estacional (57.41%), AH3N2 estacional (53.63%) así como para influenza B (90.94%). La vacuna FLUARIX mostró la presencia de influenza AH1N1 estacional (73.25%), AH3N2 estacional (74.10%) e influenza B (93.32%). Asimismo, la secuencia del control proporcionado por la SSA fue identificada como influenza AH1N1 pandémica (45.03%). Los valores detectados muestran que corresponden a influenza AH1N1. De la misma manera, el control proporcionado por TessArae detectó, como se esperaba, las secuencias nucleotídicas de influenza estacionaria AH1N1, AH3N2, influenza B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae* simultáneamente. Estos resultados muestran la estandarización de las técnicas para la detección de influenza y además, corroboraron que el microarreglo RPM-Flu v3.1 puede identificar a múltiples patógenos a la vez sin presentar problemas de reacciones cruzadas.

Para esta investigación se obtuvieron 233 muestras de exudados faríngeos de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México. El microarreglo RPM-Flu 3.1 fue capaz de detectar la secuencia que codifica para la proteínas de matriz M1 y M2 del virus de influenza AH1N1 pandémica en la mayoría de las muestras y las secuencias que codifican para las proteínas neuraminidasa y hemaglutinina del virus de influenza AH1N1 pandémica en las restantes. Estas secuencias hibridaron a su secuencia complementaria en el microarreglo y por medio de la re-secuenciación se obtuvieron fragmentos de estas secuencias que corresponden a los patógenos identificados.

Los resultados del microarreglo mostraron que de las 198 muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica por RT-PCR, 70 fueron confirmadas para influenza AH1N1 pandémica, tres para influenza AH3N2 estacional, tres para influenza B y dos para influenza AH1N1 estacional. El microarreglo RPM-Flu 3.1 confirmó las 35 muestras negativas para influenza AH1N1 pandémica previamente analizadas por qPCR.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas con el microarreglo RPM-Flu 3.1 presentaron puntajes C3 mayores a 10. Las muestras se identificaron como positivas cuando el puntaje C3 fue mayor a 20, en las muestras que presentaron un puntaje C3 de entre 10 y 20 se tuvo que analizar el valor de expectativa E para identificarlas como positivas. Todas las muestras cuyo puntaje C3 resultó entre 10 y 20 presentaron un valor de expectativa E menor a $1E-10$ identificando a esas muestras como positivas.

Los resultados anteriores nos permitieron detectar la presencia de diferentes tipos y subtipos del virus de influenza: influenza AH1N1 pandémica, influenza AH3N2 estacional, influenza B e influenza AH1N1 estacional.

En cuanto a las muestras que resultaron ser negativas para el virus de influenza AH1N1 pandémica con el microarreglo RPM-Flu 3.1 pero positivas por qPCR se logró la detección de otros patógenos asociados a enfermedades respiratorias. Las secuencias nucleotídicas obtenidas de estos patógenos presentaron puntajes C3 mayores a 20 y estas correspondieron en su mayoría a patógenos bacterianos.

Consideramos que en general las muestras resultaron contener baja cantidad y calidad del RNA ya que el microarreglo RPM-Flu 3.1 solo fue capaz de confirmar 70 de las 198 muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica por qPCR. La diferencia entre ambas técnicas se debe en gran parte a que probablemente el RNA de las muestras obtenidas de Oaxaca se degradó durante el traslado. En cuanto a las muestras obtenidas de Nuevo León, la mayoría fueron colectadas durante la pandemia del 2009 y fueron analizadas hasta finales del año 2011, lo cual podría explicar la degradación del RNA en las muestras. Esto es apoyado ya que las muestras colectadas en el brote de Diciembre, 2011-Febrero, 2012 fueron detectadas con el microarreglo RPM-Flu 3.1 de forma más eficiente.

Los resultados obtenidos nos permitieron identificar mayormente al subtipo de influenza AH1N1 pandémica tanto en la población del estado de Nuevo León como en Oaxaca, México debido a que la gran mayoría de los casos analizados (70 de 233)

presentó infección del virus de influenza AH1N1 pandémica indicando la alta prevalencia de este subtipo en los estados de Nuevo León y Oaxaca, México. Estos resultados son de esperarse ya que la pandemia que ocurrió en abril del 2009 tuvo tres brotes durante primavera, verano y otoño de ese año y un último cuarto brote que ocurrió durante Diciembre 2011-Febrero 2012.

Los otros subtipos de influenza A identificados fueron los subtipos AH1N1 estacional (2 casos) y AH3N2 estacional (3 casos) y el tipo de influenza B (3 casos). Estos tipos y subtipos del virus de influenza siguen circulando en México, afectando principalmente a niños pequeños, ancianos, pacientes inmunosuprimidos, y las personas con enfermedades subyacentes, como una enfermedad cardíaca o asma.

Por otro lado, el comportamiento de la pandemia de influenza AH1N1 2009 se caracterizó por una alta tasa de mortalidad que se le atribuyó a varios factores de la salud. En un estudio llevado a cabo en Estados Unidos (Louie *et al.*, 2009), esta alta tasa de mortalidad se atribuye a la co-infección que presenta el virus de la influenza AH1N1 pandémica con otras bacterias, especialmente del género *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Staphylococcus*. Es por eso que este estudio tuvo como uno de sus objetivos determinar las co-infecciones del virus de la influenza AH1N1 pandémica en México utilizando el microarreglo RPM-Flu 3.1 que permite la detección simultánea de una amplia variedad de bacterias y virus asociados a enfermedades respiratorias (Lin *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos lograron determinar los géneros de bacterias y virus que presentan co-infección con influenza AH1N1 pandémica en la población de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México. En las muestras analizadas se identificaron los géneros bacterianos y virales que presentaron co-infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica los cuales fueron: *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Rinovirus*, *Coronavirus* y *Coxsackie*.

Estos resultados permitieron determinar la infección simultánea de patógenos asociados a influenza con las bacterias del género *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Neisseria* y *Staphylococcus*. Adicionalmente, también encontramos la presencia de *Rinovirus* en seis casos y dos de estos casos presentaron una co-infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica. Esto es similar a lo publicado en un estudio por J.S. Casalegno y sus colaboradores en el 2010, el cual menciona que el *Rinovirus* demoró la circulación de la pandemia de influenza AH1N1 en Francia en el 2009. Estos autores encontraron co-infección entre el virus de influenza AH1N1 pandémica y el *Rinovirus* en solo 15 de 955 casos. Se cree que esta interferencia puede ser debida a la respuesta inmune innata no específica ya que ha habido reportes en el cual el interferón induce un estado refractario a la infección por virus de células vecinas.

Nuestros resultados contrastan con los estudios llevados a cabo en Estados Unidos (Louie *et al.*, 2009) en el cual encontraron que las bacterias del género *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Staphylococcus* fueron las únicas que presentaron co-infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica, investigadores en España (Cilloniz *et al.*, 2012) encontraron a las bacterias del género *Streptococcus* y *Pseudomonas* presentando co-

infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica, y en Argentina (Palacios *et al.*, 2009) las bacterias del género *Haemophilus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* presentaron co-infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica. En ésta tesis identificamos además de las bacterias del genero *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, y *Staphylococcus* una co-infección entre el virus de influenza AH1N1 pandémica con la bacteria *Neisseria meningitidis* en las poblaciones de los estados de Nuevo León y Oaxaca, México.

La bacteria *Neisseria meningitidis* no se había descrito en la literatura como patógeno que presentara co-infección con el virus de influenza tanto la estacional como la pandémica. Esto podría deberse a las diferencias socio-económicas y culturales que presenta México en comparación con otros países más desarrollados.

La bacteria *Neisseria meningitidis* es un patógeno asociada a infecciones del tracto respiratorio y es causante de infecciones respiratorias en países sub-desarrollados debido probablemente a la falta de higiene, mala alimentación y falta de atención médica.

En cuanto a los porcentajes de los casos que presentaron co-infección de influenza AH1N1 pandémica con bacterias asociadas a enfermedades respiratorias, se observa una marcada diferencia con los estudios de España (Cilloniz *et al.*, 2012) y Estados Unidos (Louie *et al.*, 2009), que mencionan porcentajes del 33% y 25% respectivamente. En nuestro estudio observamos que el 70% de las muestras positivas para influenza AH1N1 pandémica presenta co-infección con bacterias asociadas a enfermedades respiratorias. Esto es debido a las diferencias socio-económicas y culturales entre países que tienen un efecto en la salud y la higiene de la población. Al hacer un análisis de los patógenos asociados a enfermedades respiratorias que fueron encontrados en la población de México, se observan diferencias entre los estados de Nuevo León y Oaxaca, México. Al obtener la relación entre casos positivos y casos totales por región, se observa que en Oaxaca los géneros *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* muestran una relación mayor de casos positivos entre casos totales. Esto en gran parte puede deberse a la diferencias socio-económicas, culturales y climáticas que existen entre Nuevo León y Oaxaca. En Nuevo León en general la población tiene un mejor nivel económico y tiene acceso a mejores centros de salud que en Oaxaca pero las condiciones climáticas en el norte suelen ser de mayor frío que en el sur.

El análisis de correlación ente influenza AH1N1 pandémica y los patógenos asociados a enfermedades respiratorias solo mostró una correlación positiva entre influenza AH1N1 pandémica con la bacteria *Neisseria meningitidis*, lo cual indica lo antes mencionado que en países subdesarrollados la infección de influenza AH1N1 pandémica esta correlacionada con la bacteria *Neisseria meningitidis* debido al mayor número de personas infectadas con esta bacteria

La vigilancia epidemiológica deberá de continuar realizándose ya que el virus de influenza A humano puede llegar a sufrir reordenamientos de sus segmentos con otros tipos de virus de influenza, tales como la aviar, generando una nueva cepa del virus de

influenza A que podría causar una nueva pandemia (Fanning *et al.*, 2002), que podría ser aún más agresiva que las anteriores debido a la falta de respuesta inmune de la población humana ante este nuevo virus.

El lapso entre el tercer brote en otoño del 2009 y el último ocurrido en Diciembre 2011–Febrero 2012 se debe a las buenas medidas preventivas, a la vacunación ante este nuevo subtipo del virus de influenza, y a una respuesta inmune adquirida en la población ante el subtipo AH1N1. Es entonces cuando se llega a la conclusión que el cuarto brote de esta pandemia fue debido a mutaciones puntuales que presentó el subtipo del virus AH1N1, evadiendo la respuesta inmune (Chowell *et al.*, 2012).

En cuanto a las edades de las personas que sufrieron hospitalizaciones y muertes en la pandemia del virus de influenza AH1N1 2009, nuestros resultados concuerdan con lo observado en un estudio realizado por (Chowell *et al.*, 2012) donde indican que la población más afectada fue la población adulta activa. Mencionan que en los tres primeros brotes que ocurrieron en el 2009, el mayor número de hospitalizaciones por influenza AH1N1 pandémica se presentó en la población adulta activa mientras que en el brote que ocurrió a finales del 2011 fueron los adultos de edad avanzada. Estos resultados también concuerdan con las edades de los pacientes de nuestras muestras ya que la gran mayoría de los pacientes que sufrieron una infección con el virus de influenza AH1N1 pandémica en el 2009 resultaron estar entre los 20 y 60 años de edad mientras que la población más afectada a finales del 2011 fueron los niños y ancianos. Esto se debe a una inmunización por parte de la población adulta activa con el virus de influenza AH1N1 pandémica en el 2009 y/o por las campañas de vacunación que se llevaron a cabo en el 2010.

13. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de ésta tesis permitieron:

- 1) Estandarizar las condiciones para la detección de diferentes tipos y subtipos de influenza así como patógenos asociados en las muestras de influenza usando el microarreglo RPM-Flu 3.1 de TessArae.
- 2) Detectar la presencia de las secuencias nucleotídicas de influenza AH1N1 pandémica, AH3N2 estacional, influenza B e influenza AH1N1 estacional en las muestras analizadas usando el microarreglo RPM-Flu 3.1 de TessArae.
- 3) Identificar principalmente al subtipo de influenza AH1N1 pandémica en las muestras analizadas tanto en la población del estado de Nuevo León como en Oaxaca, México (70 casos).
- 4) Determinar la infección simultánea de patógenos asociados a influenza AH1N1 pandémica con el análisis de las secuencias de las bacterias del género *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Staphylococcus* y *Klebsiella*, y con *Moraxella*, *Rinovirus*, *Coronavirus* y *Coxsackie*.
- 5) Detectar las co-infecciones entre el virus de influenza AH1N1 pandémica en la población de Nuevo León con las bacterias del género *Streptococcus* en 49 casos, *Haemophilus* en 29 casos, *Neisseria* en 13 casos, *Pseudomonas* en 38 casos y *Staphylococcus* en siete casos y con *Moraxella* en seis casos, *Rinovirus* en seis casos y *Coronavirus* en dos casos.
- 6) Encontrar las co-infecciones entre el virus de influenza AH1N1 pandémica en la población de Oaxaca con las bacterias del género *Streptococcus* en 43 casos, *Haemophilus* en 37 casos, *Pseudomonas* en 22 casos, *Neisseria* en 24 casos, *Staphylococcus* en cinco casos, *Klebsiella* en un caso y con el virus *Coxsackie* en dos casos.
- 7) Detectar una mayor proporción de co-infección con las bacterias del género *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Neisseria* y *Staphylococcus* en las muestras de influenza AH1N1 pandémica en el estado de Oaxaca comparadas con Nuevo León, México.

8) Identificar los géneros de patógenos que presentaron mayor porcentaje de asociación con los casos positivos de influenza AH1N1 pandémica con la prueba Phi (*Streptococcus* 40.4%, *Haemophilus* 36.4%, *Pseudomonas* 34% y *Neisseria* 35%).

9) Encontrar una correlación positiva entre el virus de influenza AH1N1 pandémica y la bacteria *Neisseria meningitidis* (0.105) utilizando la prueba de correlación de Pearson.

10) Encontrar tres correlaciones negativas entre el virus de influenza AH1N1 pandémica y *Moraxella* (-0.135), *Rinovirus* (-0.325) y *Parainfluenza* (-0.295) utilizando la prueba de correlación de Pearson.

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad para detectar la aparición de nuevos re-arreglos específicos al gen de matriz, neuraminidasa y hemaglutinina del virus de influenza AH1N1 pandémica en pacientes de los estados de Nuevo León y Oaxaca en México. Si consideramos que la secuencia que codifica para las proteínas de matriz M1 y M2 es la más identificada es posible la vigilancia y detección de nuevos re-arreglos de influenza en cuanto a esta secuencia se refiere usando el microarreglo RPM-Flu 3.1. Además de también poder determinar los patógenos asociados a los virus de influenza B, AH3N2 estacional y AH1N1 estacional ya que en la actualidad la gran mayoría de los casos positivos de influenza son debidos a estos tipos y subtipos.

14. LITERATURA CITADA

WHO, 2009. Current WHO phase of pandemic alert. Disponible en el sitio de red :
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase/en/print.html

Adam LH, Maselli JH, Cabana MD. 2009. Changes in Prescribing of Antiviral Medications for Influenza Associated With New Treatment Guidelines. *Am J Public Health* 99:S362-S364

Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. 2008. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: A complete genome study *Virology* 7;5:40.

Sánchez Tarragó N. 1996. Infecciones respiratorias agudas. Reporte Técnico de Vigilancia 1 (1), En:<http://www.sld.cu/instituciones/uats/RTV/>

Bouvier NM, Palese P. 2008. Oseltamivir-resistant novel influenza A (H1N1) virus infection in two immunosuppressed patients. *The biology of influenza viruses*. *CDC* 58:893-896.

Cheung TKW, Poon LLM. 2007. Biology of Influenza A Virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1102: 1– 25.

Suzuki Y. 2005. Sialobiology of Influenza Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28(3) 399-408.

Basler CF. 2007. Influenza Viruses: Basic Biology and Potential Drug Targets. *Infectious Disorders - Drug Targets*. 7:282-293.

Rivera García, Oscar. 2009 Influenza Aviar. *Enfermedades Infecciosas, Medicina Preventiva y Salud Pública*. Artículo de opinión No 18.

Medina R, Garcia-Sastre A. 2011. Influenza A viruses: new research developments, *Nature*; Vol. 9.

White JM. 1990. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu Rev Physiol* 52: 675-97.

Steinhauer DA, Skehel JJ. 2002. Genetics of Influenza viruses. *Annu Rev Genet.*; 36:305-32. Epub

Garcia-Garcia J, Ramos C. 2006. La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Publica Mex*; 48:244-267.

Hollenbek JE. 2005. An avian connection as a catalyst to the 1918-1919 influenza pandemic. *Int J Med Sci*; 2(2): 87-90.

Noda T, Sagara H, Yen A. 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*. 439: 490-492.

Anders Wallensten. 2006. Influenza A Virus in Wild Birds, Department of Molecular and Clinical Medicine (IMK), Division of Molecular Virology, Faculty of Health Sciences, Linköping University, Suecia,

De Jong, M. D, Hien T. 2006 Avian Influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 35, 2-13.

Hilleman M. 2002. Realities and enigmas of human viral Influenza: pathogenesis, epidemiology and control , *Vaccine*, p-3068-3087.

Fanning T, Slemons R, Reid A. 2002. 1917 Avian Influenza Virus Sequences Suggest that the 1918 Pandemic Virus Did Not Acquire Its Hemagglutinin Directly from Birds. *Journal of Virology*, Aug. p.7860-7862.

Pinon RA, Oropesa FS, Aragonés LC. 2005. Influenza y vacunación. *Rev Biomed*; 16 (1): 45-53.

Torres A, Cilloniz C, Ewig S. 2012. Bacterial Co-infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *Journal of Infection*. 65, 223-230.

Brundage J, Shanks D. 2008. Deaths from Bacterial Pneumonia during 1918-19 Influenza Pandemic. *Emerging Infectious Diseases*. Vol.14, No. 8, 1193-1199.

Malhotra R, Ward M, Bright H. 2003. Isolation and characterization of potential respiratory syncytial virus receptor (s) on epithelial cells. *Microbes infect*. 5:123-133.

Sebastian MR, Lodha R, Kabra SK. 2009. Swine Origin Influenza (Swine Flu) *Indian J Pediatr*.76: 833-841.

Likitnukul S, Boonsiri K, Tangsuksant Y. 2009 Evaluation of Sensitivity and Specificity of Rapid Influenza Diagnostic Tests for Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus. *Pediatr Infect Dis J*. 28(11):1038-9.

Vasoo S, Stevens J, Singh K. 2009. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (Swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis*. 1;49(7):1090-3.

Das A, Spackman E, Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL. 2009. Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with

cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of Avian influenza virus by RT-PCR. *J Vet Diagn Invest.* 21(6):771-8.

Lin B, Mahony JB, Hatchette T, Ojkic D, Drews SJ, Gubbay J, Low DE, Petric M, Tang P, Chong S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M. 2009. Multiplex PCR tests sentinel the appearance of pandemic influenza viruses including H1N1 swine influenza. *J Clin Virol.*45(3):200-2.

Wang Z, Malanoski AP, Lin B, Kidd C, Long NC, Blaney KM, Thach DC, Tibbetts C, Stenger DA. 2008. Resequencing microarray probe design for typing genetically diverse viruses: human rhinoviruses and enteroviruses. *BMC Genomics.*1;9:577

Metzgar D, Myers CA, Russell KL, Faix D, Blair PJ. 2010. Single Assay for Simultaneous Detection and Differential Identification of Human and Avian Influenza Virus Types, Subtypes, and Emergent Variants. *PLoS ONE* 5(2): e8995.

Lin B, Malanoski AP, Wang Z, Blaney KM, Long NC, Meador CE, Metzgar D, Myers CA, Yingst SL, Monteville MR, Saad MD, Schnur JM, Tibbetts C, Stenger DA. 2009. Universal detection and identification of avian influenza virus by use of resequencing microarrays. *J Clin Microbiol.*47(4):988-93.

Baochuan Lin, Malanoski A, Zheng Wang. 2009. Universal Detection and Identification of Avian Influenza Virus by Use of Resequencing Microarrays. *Journal of Clinical Microbiology.* vol. 47 no.4 988-993.

Louie J, Jean C, Chen T. 2009. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A(H1N1). *Morbidity and Mortality Weekly Report.* Vol.58 No. 38 pp. 1071-1074.

Casalegno J, Ottmann M, Bouscambert D. 2010. Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic Influenza A(H1N1) 2009 virus in France. *Clin Microbiol.* 16(4):326-329.

Cilloniz C, Ewig S, Menendez R. 2012 Bacterial co-infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *Journal of Infection.* 65(3): 223-230.

Palacios G, Hornig M, Cisterna D. 2009 *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 Pandemic Influenza. *Plos One* 4(12):e8540.

Chowell G, Echevarría-Zuno S, Viboud C, Simonsen L, Tamerius J, et al. 2011 Characterizing the Epidemiology of the 2009 Influenza A/H1N1 Pandemic in Mexico. *PLoS Med* 8(5): e1000436. doi:10.1371/journal.pmed.1000436

15. APENDICE A

ID muestra	Patógeno Asociado	Secuencia Identificada	Puntaje C3	Valor E	Secuencia Comparada
11	<i>Pseudomonas putida</i>	PSAEGYRA	39.3	4.00E-36	<i>Pseudomonas putida</i> strain 31920-1 ParC (parC) gene, partial cds
12	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	47.899	4.00E-75	<i>Streptococcus mitis</i> strain QH17 mitilysin gene, complete cds
	<i>Rinovirus</i>	HRV16UTR	44.068	5.00E-103	<i>Human rhinovirus 21</i> strain ATCC VR-1131, complete genome
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	61.089	4.00E-52	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
14	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	68.487	2.00E-138	<i>Streptococcus mitis</i> strain 990123 mitilysin gene, complete cds
	<i>Pseudomonas sp.</i>	PSAEGYRA	63.035	3.00E-53	<i>Pseudomonas sp.</i>
21	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNGYRA	25.108	9.00E-43	<i>Streptococcus mitis</i> B6 complete genome, strain B6
	<i>Rinovirus</i>	HRV85UTR	55.224	1.00E-97	<i>Human rhinovirus 29</i> strain ATCC VR-1139, complete genome
23	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	66.387	2.00E-135	<i>Streptococcus mitis</i> strain COL15 mitilysin gene, complete cds
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	26.141	3.00E-55	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	53.307	2.00E-135	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7,

					complete genome
24	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	34.632	7.00E-62	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	80.083	7.00E-166	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
	<i>Pseudomonas putida</i>	PSAEGYRA	54.864	3.00E-48	<i>Pseudomonas putida</i> strain 31920-1 ParC (parC) gene, partial cds
29	<i>Pseudomonas mendocina</i>	PSAEGYRA	31.907	2.00E-21	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp, complete genome
31	<i>Pseudomonas putida</i>	PSAEGYRA	42.412	2.00E-32	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome
32	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	93.487	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	17.814	3.00E-27	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	22.656	2.00E-41	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PSAEGYRA	31.518	3.00E-24	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome
33	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	14.916	8.00E-44	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN034183 draft genome
34	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	15.145	5.00E-23	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome

	<i>Pseudomonas mendocina</i>	PSAEGYRA	45.914	2.00E-37	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01, complete genome
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUGYRA	71.639	2.00E-134	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus TW20, complete genome
36	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUMECA	52.916	3.00E-113	<i>Staphylococcus aureus</i> mecA gene for penicillin binding protein 2', complete cds, strain: 80s-4
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	94.328	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
38	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	39.676	3.00E-66	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	15.625	8.00E-38	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	88.445	1.00E-174	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds
40	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	87.552	3.00E-170	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	42.773	2.00E-87	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
41	<i>Pseudomonas putida</i>	PSAEGYRA	42.802	5.00E-36	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome
42	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	95.168	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds

	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUMECA	82.505	5.00E-165	<i>Staphylococcus aureus</i> mecA gene for penicillin binding protein 2', complete cds, strain: 80s-4
43	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	78.355	3.00E-147	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 3180 DNA gyrase A subunit gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	31.579	8.00E-58	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	17.012	1.00E-40	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha 14 complete genome
44	<i>Pseudomonas mendocina</i>	PSAEGYRA	31.518	5.00E-26	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome
47	<i>Pseudomonas</i>	PSAEGYRA	21.401	6.00E-05	<i>Methylobacillus</i> sp. SK1 DNA gyrase subunit A-like gene, partial sequence
48	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	19.433	1.00E-23	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
50	<i>Virus Parainfluenza</i>	PIV3M	22.892	2.00E-52	<i>Human parainfluenza virus 3</i> strain LZ22, complete genome
51	<i>Virus Parainfluenza</i>	PIV3NC	73.536	7.00E-143	<i>Human parainfluenza virus 3</i> strain LZ22, complete genome
53	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	94.813	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN994039 draft genome
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	68.05	3.00E-136	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	48.242	1.00E-93	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
55	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	37.879	4.00E-68	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds

	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	43.32	9.00E-82	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
56	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	85.714	1.00E-171	<i>Streptococcus mitis</i> strain R76 mitilysin gene, complete cds
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	21.784	4.00E-35	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	76.562	9.00E-155	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
	<i>Pseudomonas putida</i>	PSAEGYRA	24.903	4.00E-20	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome
57	<i>Pseudomonas entomophila</i>	PSAEGYRA	37.743	7.00E-30	<i>Pseudomonas entomophila</i> str. L48 chromosome, complete sequence
60	<i>Streptococcus PNEUMONIAE</i>	STPNLYTP	95.168	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	22.065	1.00E-11	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	25.519	2.00E-65	<i>Neisseria meningitidis</i> M04-240196, complete genome
61	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	25.84	1.00E-58	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	25.292	2.00E-17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
63	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	90.546	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds

	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	57.422	2.00E-115	<i>Neisseria meningitidis</i> M04-240196, complete genome
64	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	82.983	3.00E-159	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75I mitilysin gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	93.568	0	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
65	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	63.655	2.00E-139	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2254 pneumolysin (ply) gene, ply-2 allele, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	23.859	4.00E-52	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	35.062	3.00E-69	<i>Neisseria meningitidis</i> M04-240196, complete genome
67	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	86.134	7.00E-174	<i>Streptococcus mitis</i> strain COL15 mitilysin gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	57.469	5.00E-126	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	56.017	5.00E-114	<i>Neisseria meningitidis</i> M04-240196, complete genome
68	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	68.482	3.00E-119	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome
	<i>Coxsackie</i>	EV68UTR	46.799	2.00E-68	Human enterovirus 68 isolate 37-99 from France, complete genome
71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	25.681	4.00E-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
75	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	91.807	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	23.651	1.00E-32	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome

	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	58.398	1.00E-113	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KLPNTOPOI SOMERASE	69.683	2.00E-127	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 980064 topoisomerase IV subunit C (parC) gene, partial cds
76	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	38.132	4.00E-31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clone pGL2B5) gyrase A subunit (gyrA) gene, complete cds
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUMECA	74.082	3.00E-147	<i>Staphylococcus aureus</i> mecA gene for penicillin binding protein 2', complete cds, strain: 80s-4
77	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	21.401	3.00E-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUGYRA	89.496	1.00E-179	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus N315 DNA, complete genome
80	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	45.914	7.00E-44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, complete genome
82	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	37.137	6.00E-88	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	28.016	2.00E-22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
83	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	26.05	1.00E-57	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	72.822	2.00E-142	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	33.984	4.00E-70	<i>Neisseria meningitidis</i> strain M17068 GyrA gene, complete cds
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	46.304	3.00E-37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds

84	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MOCACOPB	22.269	2.00E-34	<i>Moraxella catarrhalis</i> outer membrane protein B2 (copB) gene, partial cds
85	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	STPNLYTP	69.538	7.00E-143	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> strain RRR472 pseudopneumolysin (pply) gene, complete cds
87	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	32.035	2.00E-56	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	34.615	8.00E-66	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
88	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	79.412	8.00E-159	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2327 pneumolysin (ply) gene, ply-17 allele, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	31.377	3.00E-54	<i>Haemophilus influenzae</i> PittGG, complete genome
89	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	21.429	2.00E-54	<i>Streptococcus mitis</i> strain R76 mitilysin gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	37.449	4.00E-71	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
90	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	77.101	1.00E-151	<i>Streptococcus mitis</i> strain R76 mitilysin gene, complete cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	31.836	7.00E-69	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
91	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	30.739	5.00E-28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
93	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	94.748	0	<i>Streptococcus mitis</i> strain R77 mitilysin gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	36.722	1.00E-71	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047 genome

	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	16.39	6.00E-26	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C FAM18 complete genome
95	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	72.199	2.00E-141	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	47.461	1.00E-96	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C FAM18 complete genome
96	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	64.523	5.00E-130	<i>Haemophilus influenzae</i> F3047 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	41.211	8.00E-81	<i>Neisseria meningitidis</i> WUE 2594 complete genome
98	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	94.538	0	<i>Streptococcus mitis</i> strain R77 mitilysin gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	40.456	1.00E-85	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	16.39	2.00E-22	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha710, complete genome
100	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	74.79	1.00E-152	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	27.53	9.00E-43	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
103	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	80.882	2.00E-165	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2237 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	21.66	8.00E-39	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
104	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	51.05	2.00E-118	<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39, complete genome
107	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	75	7.00E-158	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> strain RRR471 pseudopneumolysin (pply) gene, complete

					cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	27.733	1.00E-44	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
112	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	19.502	2.00E-31	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
128	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	93.067	2.00E-180	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2254 pneumolysin (ply) gene, ply-2 allele, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	84.855	4.00E-176	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
131	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	26.848	9.00E-19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
	<i>Rinovirus</i>	HRV14UTR	44.118	4.00E-71	<i>Human rhinovirus</i> 4, complete genome
132	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	73.95	1.00E-148	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
133	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	84.664	2.00E-169	<i>Streptococcus mitis</i> B6 complete genome, strain B6
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	24.689	5.00E-68	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUGYRA	40.336	2.00E-100	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus JKD6159, complete genome
142	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNGYRA	39.394	4.00E-78	<i>Streptococcus mitis</i> B6 complete genome, strain B6
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	31.579	3.00E-65	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	24.689	3.00E-54	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha710, complete genome
	<i>Rinovirus</i>	HRV89UTR	45.969	8.00E-81	<i>Human rhinovirus</i> type 89 (HRV89), complete genome

	<i>Moraxella catarrhalis</i>	PSAEGYRA	22.568	4.00E-08	<i>Moraxella catarrhalis</i> DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds
144	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	54.412	2.00E-114	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2254 pneumolysin (ply) gene, ply-2 allele, complete cds
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MOCACOPB	57.983	4.00E-117	<i>Moraxella catarrhalis</i> outer membrane protein B2 (copB) gene, partial cds
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	11.618	3.00E-25	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58, complete genome
146	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	77.821	6.00E-79	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
	<i>Coronavirus</i>	HCVOC43NC	30.081	4.00E-82	<i>Human coronavirus</i> OC43 serotype OC43-Paris, complete genome
149	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	64.916	2.00E-134	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	70.747	3.00E-139	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	21.369	9.00E-38	<i>Neisseria meningitidis</i> NZ-05/33, complete genome
150	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	50.63	3.00E-115	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2018 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds
152	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	53.345	2.00E-123	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	16.369	9.00E-38	<i>Neisseria meningitidis</i> NZ-05/33, complete genome
154	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	60.084	5.00E-129	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 81 pneumolysin (ply) gene, ply-1 allele, complete cds

	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	14.73	3.00E-22	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
178	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	88.445	7.00E-177	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2254 pneumolysin (ply) gene, ply-2 allele, complete cds
179	<i>Influenza AH3N2</i>	FLUAM(H3N2)	97.534	0	Influenza A virus (A/Beijing-Xuanwu/132/2006(H3N2)) segment 7 sequence
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUMECA	11.231	2.00E-25	<i>Staphylococcus aureus</i> SCCmec type IVc element, complete sequence
181	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUGYRA	87.395	3.00E-177	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Mu3 DNA, complete genome
187	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	20.623	1.00E-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MOCACOPB	17.765	2.00E-38	<i>Moraxella catarrhalis</i> outer membrane protein B2 (copB) gene, complete cds
191	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNGYRA	14.069	3.00E-27	<i>Streptococcus mitis</i> B6 complete genome, strain B6
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	22.407	6.00E-42	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	35.156	1.00E-73	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha710, complete genome
192	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	80.672	8.00E-162	<i>Streptococcus mitis</i> B6 complete genome, strain B6
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	93.568	0	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
193	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	18.182	1.00E-38	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds

215	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	19.838	3.00E-42	<i>Haemophilus influenzae</i> type b outer membrane protein P5 (ompP5) gene, complete cds
221	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	STPNLYTP	24.79	1.00E-58	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> strain RRR472 pseudopneumolysin (pply) gene, complete cds
222	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	34.454	2.00E-83	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINOMPP5	28.543	8.00E-49	<i>Haemophilus influenzae</i> F3031 genome
238	<i>Neisseria meningitis</i>	NEMEGYRA	12.891	7.00E-21	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha710, complete genome
244	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	12.338	2.00E-43	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
247	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	31.385	2.00E-55	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	31.535	7.00E-64	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	56.224	2.00E-109	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha 14 complete genome
251	<i>Influenza H3N2</i>	FLUANA2	81.132	0	Influenza A virus (A/Texas/NHRC0001/2011(H3N2)) neuraminidase (NA) gene, complete cds
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MOCACOPB	18.697	2.00E-40	<i>Moraxella catarrhalis</i> strain O12E outer membrane protein CopB gene, complete cds
	<i>Klebsiella</i>	KLPNTOPOI SOMERASE	25.792	2.00E-28	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain

					980064 topoisomerase IV subunit C (parC) gene, partial cds
	<i>Pseudomonas sp.</i>	PSAEGYRA	44.747	1.00E-48	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUGYRA	70.168	1.00E-143	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus COL, complete genome
255	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	18.257	1.00E-25	<i>S.pneumoniae</i> autolysin (lytA) gene, complete cds
	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	PSAEGYRA	23.346	7.00E-17	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. brassicacearum NFM421, complete genome
256	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	17.247	2.00E-26	<i>Streptococcus pneumoniae</i> partial lytA gene for autolysin, strain PN58
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	26.848	6.00E-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
257	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	53.527	9.00E-119	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	21.992	1.00E-30	<i>Neisseria meningitidis</i> 053442, complete genome
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PSAEGYRA	34.63	4.00E-28	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 complete genome
	<i>Human rinovirus</i>	HRV85UTR	19.616	6.00E-21	<i>Human rinovirus A</i> isolate N13, complete genome
258	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	78.571	7.00E-161	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 319 pneumolysin (ply) gene, ply-8 allele, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	85.477	1.00E-169	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
	<i>Pseudomonas sp.</i>	PSAEGYRA	23.346	8.00E-19	<i>Pseudomonas Sp.</i>
263	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUGYRA	20.378	9.00E-57	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus

					COL, complete genome
265	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	31.518	1.00E-24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain WUXIPA06 DNA gyrase (gyrA) gene, partial cds
266	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	14.63	5.00E-26	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4, complete genome
267	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSAEGYRA	49.416	9.00E-46	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome
268	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	STPNLYTP	18.067	2.00E-47	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> strain RRR472 pseudopneumolysin (pply) gene, complete cds
	<i>Pseudomonas fragi</i>	PSAEGYRA	47.471	3.00E-45	<i>Pseudomonas sp.</i>
270	<i>Streptococcus mitis</i>	STPNLYTP	55.462	6.00E-110	<i>Streptococcus mitis</i> strain R75II mitilysin gene, partial cds
275	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	82.353	2.00E-164	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2196 pneumolysin (ply) gene, ply-2 allele, complete cds
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HAINGYRA	25.311	4.00E-43	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	50.622	5.00E-105	<i>Neisseria meningitidis</i> G2136, complete genome
	<i>Pseudomonas syringae</i>	PSAEGYRA	20.233	5.00E-13	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000, complete genome
277	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	56.277	5.00E-94	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 GyrA (gyrA) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	81.328	2.00E-159	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome

	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEGYRA	10.547	3.00E-26	<i>Neisseria meningitidis</i> G2136, complete genome
280	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	14.108	4.00E-21	<i>Streptococcus pneumoniae</i> partial <i>lytA</i> gene for autolysin, strain 670
	<i>Staphylococcus aureus</i>	STAUMECA	13.823	6.00E-36	<i>Staphylococcus aureus</i> strain cm11 SCCmec type IVA element, complete sequence; and hypothetical protein X gene, partial cds
281	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTA	15.56	2.00E-22	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4, complete genome
285	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNGYRA	22.511	1.00E-38	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 4391 <i>GyrA</i> (<i>gyrA</i>) gene, complete cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	49.17	3.00E-103	<i>Haemophilus influenzae</i> F3031 genome
	<i>Neisseria meningitidis</i>	NEMEMVIN	18.88	3.00E-26	<i>Neisseria meningitidis</i> alpha710, complete genome
	<i>Pseudomonas syringae</i>	PSAEGYRA	28.794	7.00E-23	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000, complete genome
286	<i>Pseudomonas syringae</i>	PSAEGYRA	43.969	5.00E-41	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000, complete genome
287	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	STPNLYTP	95.588	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain RLUH-PN8 extrachromosomal autolysin (<i>lytA</i>) gene, partial cds
	<i>Haemophilus influenzae</i>	HAINGYRA	91.909	0	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MOCACOPB	19.958	3.00E-41	<i>Moraxella catarrhalis</i> outer membrane protein B2 (<i>copB</i>) gene, complete cds

288	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PSAEGYRA	29.572	1.00E-21	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , complete genome
-----	--------------------------------	----------	--------	----------	--