

TRABAJO FIN DE MÁSTER

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL
SUBTIPO DEL VIRUS DE INFLUENZA
A CIRCULANTE EN LA CABAÑA DE
PORCINOS EN ESPAÑA MEDIANTE
PCR EN TIEMPO REAL Y
SECUENCIACIÓN

Autora:

LUNA MAZAS CABETAS

Directores:

ALFREDO A. BENITO ZÚÑIGA

MARÍA F. FILLAT CASTEJÓN

EXOPOL S.L.

AÑO 2021



Universidad
Zaragoza



D. Alfredo Benito Zúñiga, Investigador responsable del Departamento de Biología Molecular y Celular de la empresa EXOPOL, y Dña. María F. Fillat Castejón, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Máster “Identificación molecular del subtipo del virus de Influenza A circulante en la cabaña de porcinos en España mediante PCR en tiempo real y secuenciación” ha sido realizado por Luna Mazas Cabetas en el Departamento de Biología Molecular y Celular de la empresa EXOPOL, bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Máster (TFM), ya que cumple los objetivos recogidos de TFM del Máster Universitario en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Septiembre 2021.

Fdo: Alfredo Benito Zúñiga

FILLAT
CASTEJON
MARIA
FRANCISCA -
DNI
18011441A

Firmado
digitalmente por
FILLAT CASTEJON
MARIA FRANCISCA
- DNI 18011441A
Fecha: 2021.09.07
09:57:13 +02'00'

Fdo: María F. Fillat Castejón

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS	3
1. RESUMEN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	6
2. 1. El virus de la Influenza A	6
2.1.1. Influenza A y salud pública.....	6
2.1.2. Repercusión económica del sector porcino en España, e importancia del control de la gripe porcina.....	7
2.2. Morfología del virión.....	8
2.3. Genoma y proteínas virales	9
2.4. Ciclo de replicación viral.....	11
2.5. Evolución y epidemiología del virus de la Influenza A.....	13
2.6. Patogénesis	16
2.7. Diagnóstico	17
2.8. Vacunas.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
4. METODOLOGÍA	19
4.1. Selección y clasificación de las muestras: casos clínicos	19
4.2. Procesamiento de muestras biológicas y extracción de ácidos nucleicos.....	22
4.3. Ensayo general de RT-qPCR para la detección del virus de la Influenza A.	22
4.4. Identificación molecular de los subtipos del virus de la Influenza A.....	23
4.4.1. Subtipado de los genes HA y NA mediante ensayos de RT-qPCR	23
4.4.2. Determinación del subtipo de los virus de la Influenza A mediante secuenciación Sanger.....	25
4.4.2.1. Amplificación de los genes HA y NA mediante RT-PCR.....	25
4.4.2.2. Visualización de los productos de amplificación	27
4.4.2.3. Secuenciación y análisis filogenético	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1. Identificación molecular del virus de la Influenza A en los casos clínicos: tipos de muestra y fases del ciclo productivo.....	28

5.2. Determinación del subtipo del virus de la Influenza A mediante RT-qPCR.....	31
5.3. Estudio de los subtipos de Influenza A por secuenciación.....	36
5.3.1. Amplificación y secuenciación Sanger de los genes HA y NA	36
5.3.2. Análisis de similitud nucleotídica entre las muestras secuenciadas.....	39
5.3.3. Análisis filogenético.....	44
5.5. Discusión general.....	49
6. CONCLUSIONES	52
7. BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXOS	

ABREVIATURAS Y SIGLAS

SIV: Swine Influenza Virus

IAV: Influenza A Virus

Av: aviar

Hu: humano

Pdm: pandémico

HA: hemaglutinina

NA: neuraminidasa

RT-qPCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RdRp: RNA-dependent RNA polymerase

NP: nucleoprotein

RNP: ribonucleoprotein

vRNA: viral RNA

vRNP: viral ribonucleoprotein

HI: hemagglutination inhibition

IHC: immunohistochemistry

Cq: cycle quantification

ESNIP: European Surveillance Network for Influenza in Pigs

1. RESUMEN

El virus de la Influenza A es el patógeno responsable de la gripe porcina (SIV), una enfermedad respiratoria con alta prevalencia en las explotaciones en nuestro país y en donde ocasiona importantes pérdidas económicas. Durante las últimas décadas, se han descrito principalmente cuatro subtipos virales de SIV (H1avN1, H1huN2, H3N2 y H1N1pdm), circulando entre la población porcina europea. Sin embargo, la rápida evolución de estos agentes ha dado lugar a la aparición de nuevos subtipos por procesos de recombinación genética característicos de estos virus.

La realización del presente estudio ha permitido identificar mediante RT-qPCR, el subtipo del 94% (124/132) de casos clínicos positivos a SIV procedentes de granjas españolas y recibidos en el laboratorio Exopol durante el año 2020. Entre los subtipos identificados, el H1avN2 (43%) fue el más frecuente, un resultado similar a lo descrito por Sosa Portugal y col. en años previos en porcinos de la península ibérica. En otros países europeos, sin embargo, el subtipo H1avN1 sigue siendo el subtipo más extendido. El resto de subtipos identificados en nuestro trabajo fueron los siguientes: H1huN2 (16%), H1avN1 (10%), H3N1 (11%), H3N2 (10%), y H1pdmN1pdm (2%).

La diversidad genética de los SIV identificados en el presente estudio fue evaluada mediante secuenciación Sanger de los genes HA y NA. Un total de 29 secuencias para el gen HA y 36 secuencias para el gen NA fueron obtenidas de casos clínicos procedentes de distintas provincias españolas. El análisis filogenético de las secuencias demostró una mayor similitud con secuencias de cepas españolas descritas en años previos que con cepas de SIV originarias de otros países europeos. Además, el gen NA se encuentra generalmente más conservado que el gen HA, aunque en este caso, las secuencias de tipo H3 presentaron la mayor similitud nucleotídica.

La vigilancia continua de los SIV es de gran importancia para la industria porcina, tanto para monitorear la evolución del virus que cambia rápidamente, como para conocer la situación epidemiológica de una región o un país. Es por estos motivos que los datos obtenidos en este trabajo no sólo nos han permitido confirmar la circulación de las tres cepas clásicas porcinas, sino que también han constituido la primera descripción de una nueva cepa H1pdmN1 en la cabaña porcina española.

ABSTRACT

The Influenza A virus is the viral pathogen responsible for Influenza A (SIV), a high prevalence respiratory disease in most Spanish pig farms where it causes significant economic losses. Over the past decades, there were mainly four viral subtypes (H1avN1, H1huN2, H3N2 y H1N1pdm) circulating on European pig population. However, the fast evolution of *influenzaviruses* has led to emergence of new subtypes.

The development of this study has allowed to identify, by RT-qPCR, the subtype of 94% (124/132) clinical cases positives to SIV. The evaluated cases came from different Spanish farms and have been received by the Exopol laboratory during th year 2020. Among the subtypes identified, H1avN2 (43%) was the most frequent, a similar result that described by Sosa Portugal et al. in previous years in pigs in Iberian Peninsula. In other European countries, however, the H1avN1 subtype remains the most widespread. The rest of the subtypes identified in our work were the following: H1huN2 (16%), H1avN1 (10%), H3N1 (11%), H3N2 (10%), and H1pdmN1pdm (2%).

The genetic diversity of the SIVs identified in the present study was evaluated by Sanger sequencing of the HA and NA genes. A total of 29 sequences for the HA gene and 36 sequences for the NA gene were obtained from clinical cases from different Spanish regions. The phylogenetic analysis of the sequences showed a greater similarity with sequences of Spanish strains described in previous years than with SIV strains from other European countries. In addition, the NA gene is usually more conserved than the HA gene, although in this study, the H3 type sequences showed the highest nucleotide similarity.

The continuous surveillance of Influenza A infection is of great importance for the pig industry, both to monitor the evolution of the rapidly changing virus and to know the epidemiological situation of a country or region. It is for these reasons that the data obtained in this work have not only allowed us to confirm the circulation of the three classic pig strains, but it has also been the first description of a new strain H1pdmN1 in the Spanish pig herd.

2. ANTECEDENTES

2. 1. El virus de la Influenza A

El virus de la Influenza A (IAV), también conocido como el virus de la gripe, se engloba dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, y se caracteriza por presentar un genoma viral segmentado compuesto por ocho fragmentos de RNA monocatenario de polaridad negativa (1,2). Esta característica es la responsable de la naturaleza cambiante de esta especie viral, que hace que evolucionen rápidamente, dando lugar a nuevas variantes capaces de escapar de la respuesta inmune y ser causa de grandes brotes epidémicos (3).

La alta variabilidad del virus de la gripe A le confiere la capacidad para afectar a múltiples especies (aves, mamíferos, etc.), siendo las aves acuáticas el reservorio primordial de todos los virus de Influenza A. Adicionalmente, este virus puede transmitirse también entre diferentes especies animales, reportándose principalmente la transmisión entre humanos y cerdos; así como de aves a humanos o cerdos (3–6).

El ganado porcino desempeña un rol esencial en la ecología del virus de la Influenza A, al actuar como un hospedador intermedio susceptible a la infección tanto de virus de origen aviar como de origen humano (3). Esa susceptibilidad posibilita, en caso de co-infección, la formación de nuevas variantes de la Influenza A por medio del intercambio de segmentos virales, lo que ha llevado a la teoría de los “recipientes de mezcla” (en inglés, *mixing vessels*) (5,7). Las similitudes antigénicas y genéticas entre ciertos subtipos de virus de la gripe aviar, porcina y humana; y la susceptibilidad de los cerdos a los virus de la Influenza A de origen aviar y humano constituyen la base de esta teoría (7). La mayoría de los virus de la gripe aviar se unen preferentemente a receptores con residuos terminales de ácido siálico con uniones tipo α -2,3, mientras que los de origen humano se unen a receptores de ácidos siálicos con uniones tipo α -2,6. Ambos receptores se expresan en las vías respiratorias de los cerdos proporcionando evidencia de que esta especie animal actúa como "recipientes de mezcla" para los virus de la gripe humana y aviar (4,8). Es también necesario señalar que los virus de Influenza A de origen porcino tienen un alto potencial zoonótico, pudiendo llegar a infectar directamente a la especie humana (6,7).

2.1.1. Influenza A y salud pública

El virus de la gripe A es considerado uno de los agentes más variables conocidos hasta ahora por la ciencia médica, debido a tres características principales: las grandes poblaciones a las que afecta, sus cortos tiempos de generación y sus altas tasas de mutación (9). Desde principios

del siglo XX, se han identificado en humanos cuatro pandemias importantes causadas por este tipo de virus (10).

La primera pandemia, conocida como “gripe española” se produjo en 1918, y fue causada por un subtipo H1N1 provocando la muerte de alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo (11). A mediados del siglo XX, en 1957, un virus H2N2 fue el responsable de la pandemia asiática que afectó a más de 45 millones de personas en Norteamérica. Once años después, en 1968, apareció un nuevo virus en Hong Kong, de subtipo H3N2; este virus se volvió endémico después del brote, siendo prevalente en la actualidad en conjunto con el subtipo H1N1 (12–14).

Recientemente, en 2009, la última pandemia de gripe A fue causada por la aparición de un virus de origen porcino, el llamado H1N1 pandémico, reforzando el interés de la salud pública por investigar las variantes del virus de la Influenza A en esta especie animal (12). Esto es fundamental, ya que la salud pública y la veterinaria avanzan hacia el concepto de “un mundo, una salud” (15).

2.1.2. Repercusión económica del sector porcino en España, e importancia del control de la gripe porcina.

El sector porcino es el sector ganadero más importante en España, segundo productor de la Unión Europea y tercer exportador a nivel mundial en este tipo de industria. Más de 161.000 personas trabajan de manera directa en España que contabiliza 86.000 granjas y más de 2.200 industrias cárnicas. Todo bajo el modelo europeo que garantiza una producción sostenible bajo uno de los estándares de bienestar animal, calidad, seguridad alimentaria y de trazabilidad más exigentes del mundo (16).

El pasado año 2020, el sector porcino (cerdo blanco) de España alcanzó su máximo histórico en exportaciones al comercializar 2.97 millones de toneladas fuera de nuestras fronteras, según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (17,18). Los mercados extracomunitarios, concretamente el mercado chino, fueron por primera vez el principal destino de las exportaciones (57,3%) con un aumento del 25% respecto al 2019 (18).

Estos datos de comercio exterior están vinculados con el aumento en el censo porcino, superando los 30 millones, y a su vez, con el aumento del número de explotaciones, fundamentalmente en la España rural, donde el sector porcino genera más de 24.000 empleos directos, lo que supone un 35% del empleo total de la industria porcina (17).

La prevalencia de la influenza porcina en España es muy elevada, alcanzando el 94% de explotaciones seropositivas (19). Sin embargo, existe cierto desconocimiento sobre la importancia del virus de la Influenza A desde el punto de vista productivo. Cuando se evalúa el impacto de este patógeno respiratorio, se distinguen generalmente dos situaciones distintas: las situaciones epidémicas y las situaciones endémicas.

En situaciones epidémicas, donde una nueva cepa del virus de la Influenza A se introduce en una explotación susceptible, el impacto es variable, afectando en ocasiones a las cerdas reproductoras. En otras fases de producción, el impacto es menor debido a la baja mortalidad y al crecimiento compensatorio, siempre y cuando se controlen las infecciones secundarias. Sin embargo, en las situaciones endémicas, las cuales ocurren cuando un virus “reside” en la explotación, el impacto del virus es difícil de evaluar por la posible interacción con otros patógenos (3,20).

En resumen, la influenza porcina es una enfermedad que puede llegar a tener un elevado impacto económico/productivo en una explotación. A día de hoy, es evidente que existe muy poca información en la bibliografía sobre el impacto de la Influenza A desde el punto de vista productivo, y quedan todavía muchas cuestiones por responder.

2.2. Morfología del virión

Los virus de la Influenza A son virus esféricos de 80-120 nm de diámetro, formados por una nucleocápside o núcleo compuesto de 8 segmentos de RNA monocatenario de simetría helicoidal que se empaquetan junto con la nucleoproteína (NP) y el complejo de polimerasa viral (PA, PB1 y PB2), tal como se puede apreciar en la Figura 1 (2). Envolviendo a esta nucleocápside existe una cubierta compuesta por una matriz interna proteica (M1) que confiere estabilidad al virión y una bicapa lipídica externa con tres proteínas transmembrana: dos glicoproteínas de superficie, llamadas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y la proteína de canal iónico (M2) (14,21,22).

Tanto la hemaglutinina (HA) como la neuraminidasa (NA) se encuentran localizadas en la superficie de la partícula viral, y constituyen las principales dianas de los anticuerpos neutralizantes, cuya síntesis es inducida en el hospedador infectado, ya sea por un virus de campo o un virus vacunal (22). Las espículas de hemaglutinina, unas 500 por partícula vírica, presentan dos dominios diferenciados; una “cabeza” globular y un “tallo”, y cada una está formada por 3 polipéptidos idénticos. Sin embargo, las espículas de neuraminidasa tienen forma

de champiñón y están formadas por 4 glicopéptidos idénticos, existiendo unas 100 por virus (14,23).

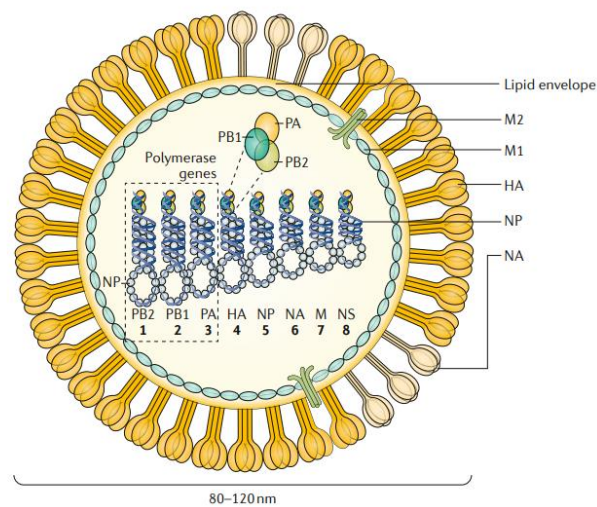


Figura 1. Morfología de una partícula viral o virión del virus de la Influenza A. Imagen tomada de Krammer F., Smith G., Fouchier R., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P., Palese P., Shaw M., Treanor J., Webster R. and García-Sastre A. (14).

2.3. Genoma y proteínas virales

El genoma viral de la Influenza A comprende ocho segmentos de RNA de polaridad negativa de 0.9 kb a 2.3 kb que en conjunto abarcan aproximadamente 13,5 kb y codifican hasta 14 proteínas (24). La longitud exacta del material genético no puede ser calculada con precisión puesto que varía en función de la cepa.

Cada segmento genómico codifica al menos una proteína viral, que puede ser estructural (segmentos 1-7) o no estructural (segmento 8). En la Tabla 1, se detallan las proteínas virales codificadas por los ocho segmentos genómicos, así como su longitud de aminoácidos (AA), y la función que desempeñan (25).

Tabla 1. Genoma del virus de la Influenza A, proteínas virales que codifica y sus respectivas funciones. Información tomada de Pleschka S. (26).

<u>Segmento genómico</u>	<u>vRNA</u>	<u>Proteína</u>	<u>AA</u>	<u>Función</u>
1	2341	PB2	759	Subunidad del RdRp con función cap-binding
2	2341	PB1	757	Parte central del dominio polimerasa del RdRp viral
		PB1-F2	87-91	Actividad pro-apoptótica
3	2233	PA	716	Subunidad endonucleasa del RdRp viral Función: cap-snatching

<u>Segmento genómico</u>	<u>vRNA</u>	<u>Proteína</u>	<u>AA</u>	<u>Función</u>
4	1778	HA	566	Glicoproteína de superficie: unión al receptor y fusión membranal
5	1565	NP	498	Nucleoproteína; encapsulación de RNA viral genómico y anti-genómico
6	1413	NA	454	Glicoproteína de superficie: destrucción de receptores Actividad neuraminidasa
7	1027	M1	252	Proteína de la matriz
		M2	97	Actividad de canal iónico, protege la conformación de la HA
8	890	NS1	230	Regula la actividad viral de RdRp Antagonista de Interferón Favorece la traducción del mRNA viral; inhibición de i) splicing del pre-mRNAii) poliadenilación del mRNAiii) actividad
		NEP	121	Factor de exportación nuclear

Los segmentos 1-3 codifican para las enzimas virales que forman parte del complejo de polimerasa viral dependiente de RNA (RdRp). El complejo transcribe los mRNA virales mediante el uso de un mecanismo único llamado cap-snatching, el cual consiste en la unión y la escisión de los pre-mRNA con caperuza del huésped (26). Dentro del complejo, PB2 funciona principalmente durante el inicio de la transcripción viral del mRNA reconociendo y uniéndose a las estructuras 5'cap del mRNA huésped para su uso como cebadores. PB1, sin embargo, es la proteína responsable de la elongación del mRNA viral naciente y también actúa como proteína de elongación para la síntesis del RNA patrón y el vRNA (2). Por último, la subunidad PA lleva a cabo una actividad endonucleasa cortando el 5'cap mRNA una vez unido por PB2.

Los segmentos 4 y 6 codifican para las glicoproteínas virales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) respectivamente, las cuales son altamente variables y se localizan en la superficie del virión, siendo las principales dianas de la respuesta inmune humoral del hospedador. La hemaglutinina es la principal glicoproteína de superficie, y es responsable de unir la partícula vírica a la célula hospedadora a través de los ácidos siálicos de superficie y fusionar la membrana viral con la membrana celular, liberando de esta manera el complejo viral dentro de la célula hospedadora (2,27). Acompañando a la hemaglutinina se encuentra la

neuraminidasa, otra glicoproteína de superficie la cual presenta dos funciones principales: liberar los viriones progenie gracias a su actividad sialidasa y ayudar a las partículas virales en la infección del tracto respiratorio de la célula hospedadora, facilitando la propagación del virus (28).

El segmento 5 codifica la nucleoproteína (NP), componente mayoritario del complejo de ribonucleoproteína (RNP), que se asocia con los segmentos del vRNA (2,26).

El segmento 7 tiene un tamaño de 1027 nucleótidos y codifica dos proteínas: M1 y M2, generadas por *splicing* del mRNA. La proteína M1 forma parte de la matriz y desempeña un papel esencial en el reclutamiento y ensamblaje de los componentes virales. La proteína M2, sin embargo, es una proteína de membrana, con una parte extracelular que es reconocida por los anticuerpos del hospedador y una parte transmembrana que actúa como un canal iónico (2). Debido a que el gen M está más conservado que la hemaglutinina o la neuraminidasa entre los diferentes subtipos virales, se utiliza como diana en los ensayos de RT-qPCR para la identificación de este virus (29,30).

Empleando una estrategia de codificación similar, el segmento 8 alberga la información de secuencia para la proteína NS1 no estructural y la proteína de exportación nuclear (NEP). NEP es un componente menor del virión y se encuentra asociado con la proteína M1(26).

La clasificación de los virus de la Influenza A está dada por la diversidad genética y antigénica de sus dos glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), habiéndose descrito hasta la fecha 18 tipos de HA y 11 tipos de NA (9,24,25). La combinación de estas glicoproteínas da lugar a los distintos subtipos virales (27). Estas combinaciones se encuentran perpetuadas en las aves acuáticas, donde el virus actúa de manera benigna. Sin embargo, cuando estos virus se transmiten a las aves de corral y a los mamíferos, evolucionan rápidamente, dando lugar en algunos casos a cepas de gran virulencia. En el caso de la especie porcina, los subtipos virales circulantes más reconocidos son H1N1, H1N2 y H3N2 (13,31).

2.4. Ciclo de replicación viral

Para entender el ciclo de replicación del virus de la Influenza A, es necesario mencionar nuevamente que el núcleo viral está formado por los ocho segmentos de RNA en asociación con la nucleoproteína viral (NP) y las subunidades de RNA polimerasa dependientes de RNA (RdRp) (PB1, PB2, y PA). En su conjunto estos componentes constituyen las unidades

biológicas de replicación y transcripción del virus de la Influenza A, denominadas complejos virales de ribonucleoproteína (Figura 2) (32,33).

El complejo de ribonucleoproteína viral (vRNP) muestra una conformación doblemente helicoidal en la que dos hebras de nucleoproteínas (NP) de polaridad opuesta se asocian entre sí a lo largo de la hélice. Ambas hebras están conectadas por un bucle corto en un extremo de la partícula e interactúan con el complejo de la polimerasa viral (PB1, PB2, y PA) en el otro extremo(23). El estudio de esta estructura permitirá una mayor comprensión de los mecanismos de importación del vRNP al núcleo, de los procesos de transcripción y replicación viral, y la encapsulación de los complejos de vRNP en los viriones progenie. Debido al papel esencial que desempeña el complejo vRNP en cada una de las etapas del ciclo de vida del virus de la Influenza A, el estudio de la estructura permitirá también obtener un mayor conocimiento de los mecanismos de patogenicidad y de adaptación al hospedador (34).

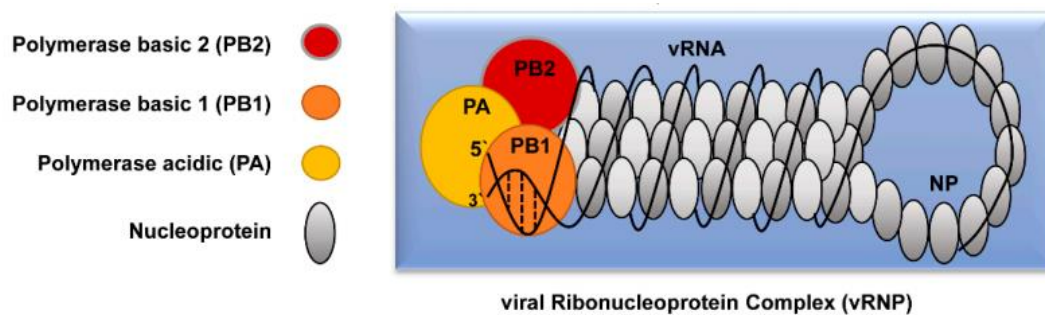


Figura 2. Estructura del complejo de la ribonucleoproteína viral. Imagen modificada de Mostafa A., Abdelwhab E., Mettenleiter T. and Pleschka S. (23).

Para una eficiente replicación viral, se requiere un equilibrio entre la unión específica de la hemaglutinina a los receptores y la actividad sialidasa de la neuraminidasa (28). La infección del virus de la Influenza A comienza cuando la hemaglutinina (HA) reconoce los receptores específicos de membrana de la célula hospedadora, y se une a ella a través de sus ácidos siálicos. Una vez se produce la unión, el virus es endocitado por vesículas recubiertas de clatrina, tras la cual y gracias a la acidificación del interior del virión por medio de la proteína M2, la hemaglutinina viral sufre un cambio conformacional que desencadena la fusión de la cubierta viral con la membrana endosomal (2,9,14).

La fusión permite que el material genético viral en forma de ocho vRNPs se libere al citoplasma y sea posteriormente transportado al núcleo gracias a mecanismos de transferencia de la célula huésped y señales de localización nuclear (Figura 3). Una vez en el interior del núcleo tiene lugar la replicación y la transcripción del genoma viral, procesos catalizados por

el complejo de polimerasa viral (PB1, PB2, PA) y la nucleoproteína (NP), y donde están implicados muchos factores propios de la célula hospedadora. En primer lugar, se produce la transcripción del vRNA para sintetizar el mRNA, a partir del cual se produce la síntesis de proteínas virales tempranas esenciales para la replicación del RNA (2,9,14).

Los vRNPs formados por RNA viral, NP y polimerasas virales recién sintetizadas son exportados desde el núcleo al citoplasma. Determinadas proteínas del hospedador estimulan la traducción del mRNA viral, para sintetizar proteínas virales como HA y NA, que serán procesadas posteriormente durante su transporte desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi. En la última etapa del ciclo viral, los componentes virales son transportados a la membrana plasmática donde se produce el ensamblaje y liberación de la progenie viral (Figura 3) (9,35).

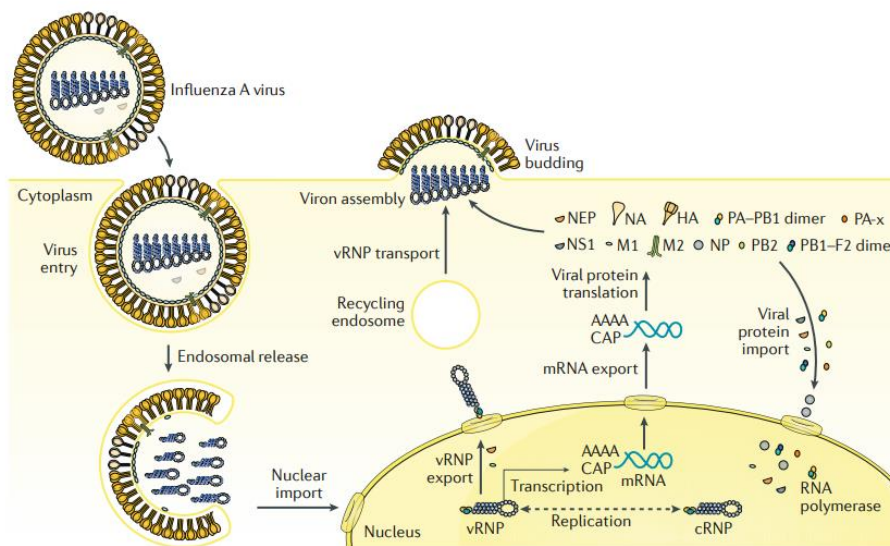


Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la Influenza A. Imagen tomada de Krammer et al. (14).

2.5. Evolución y epidemiología del virus de la Influenza A.

Los virus de la Influenza A son capaces de evolucionar rápidamente y dar lugar a nuevas progenies por medio de dos mecanismos: la acumulación de mutaciones puntuales provocadas por fallos del complejo de polimerasa viral conocida como “deriva antigénica”, y la incorporación al azar de segmentos de RNA en la partícula vírica cuando un mismo hospedador es co-infectado por virus de diferente origen, denominado “cambio antigénico” (Figura 4) (23,31).

En el caso de la gripe humana, la deriva antigénica (*antigenic drift*) es la responsable de las epidemias que se producen anualmente, ya que la formación de nuevas variantes les confiere

capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador (27). Las constantes mutaciones en las proteínas antigénicas HA y NA son las que contribuyen en mayor medida a la evolución gradual del virus, generando variantes víricas capaces de escapar de la presión inmune de una población. Como consecuencia, el sistema inmunitario del hospedador es incapaz de identificar las nuevas variantes del virus y el reconocimiento antígeno-anticuerpo ya no es completamente funcional. Adicionalmente, las proteínas HA y NA determinan el rango del hospedador debido a la diferente especificidad de los virus humanos y aviáres por los receptores. Se ha visto que posibles sustituciones de aminoácidos en la proteína HA influyen en el cambio de preferencia del virus de la gripe en relación al receptor utilizado (8,9,36). Sin embargo, en el porcino, la deriva antigénica no ocurre con tanta frecuencia, ya que el virus de la Influenza porcina (SIV) al encontrar constantemente nuevas fuentes de contagio en las explotaciones no depende tanto de este tipo de mutación para poder sobrevivir (37).

Por otro lado, el cambio antigénico (*antigenic shift*) es consecuencia de la naturaleza segmentada del genoma de los virus del género *Influenza* (27). La alta variedad de reservorios que presenta el virus de la Influenza A constituye una fuente de genes de HA y NA antigénicamente diversos que se pueden intercambiar entre cepas virales, conduciendo a la aparición de nuevos subtipos virales, con alta transmisibilidad a otros hospederos (3). Este intercambio de material genético (reordenamiento genético) ocurre comúnmente en la especie porcina, en donde el cerdo funciona como “recipiente mezclador” debido a la expresión de receptores aviáres (α -2,3) y humanos (α -2,6) en sus células epiteliales del aparato respiratorio (5,9,25).

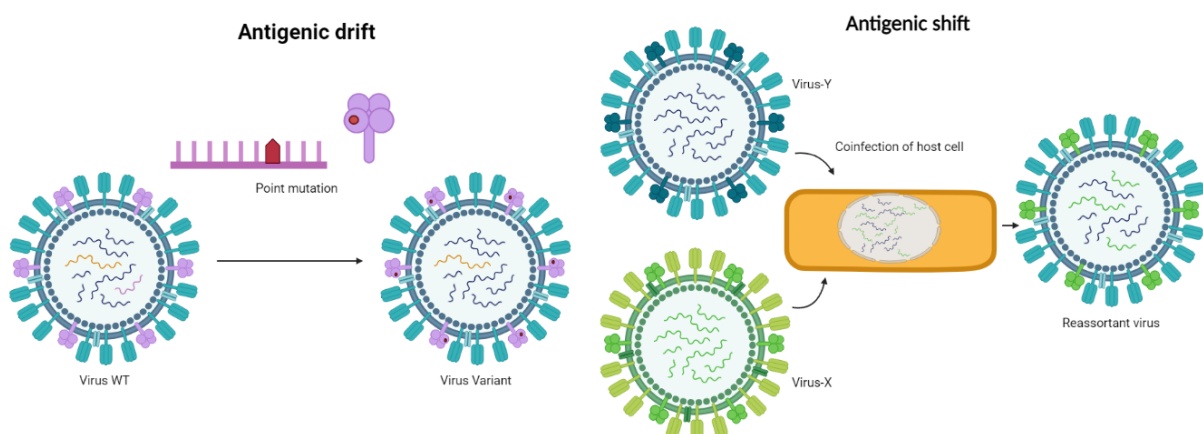


Figura 4. Mecanismos de evolución de los virus de Influenza: *antigenic drift* y *antigenic shift*. Figura creada por la autora de la memoria a partir de Biorender.

Estos reordenamientos genéticos o *reassortments* no sólo permiten la transmisión del virus entre especies distintas, por la adaptación de éste a un nuevo hospedador; sino que pueden

resultar también en la generación de variantes con cambios en la patogenicidad o en el comportamiento epidemiológico, y llegar incluso al establecimiento de cepas potencialmente pandémicas (9,25,36).

Hasta 2009, en la población porcina europea circulaban tres subtipos de virus de la Influenza A: H1N1, H1N2 y H3N2 (31). Estos subtipos se diferenciaban de las cepas virales existentes en Norte América y en Asia, ya que la segregación de estos virus en los diferentes continentes hizo que evolucionaran distintamente (36). En Europa, todos los virus H1N1 son enteramente de origen aviar; introducidos a partir de aves acuáticas en 1979; por lo que se les denomina virus H1N1 “tipo aviar” (H1_{av}N1) (3). Este subtipo sustituyó rápidamente al linaje H1N1 tipo clásico derivado del virus humano de 1918 que estuvo circulando en los años previos (38). En 1984, tras la pandemia de Hong-Kong se introdujo un virus estacional humano H3N2 en cerdos europeos. Sin embargo, este virus sólo consiguió extenderse tras recombinarse con el virus H1_{av}N1, del que adquirió los 6 genes internos, pero mantuvo los genes HA y NA del virus humano (39). En 1994, una nueva reordenación afectó al virus H3N2 porcino, y como consecuencia, este virus intercambió su fragmento genómico HA con el de otro virus estacional humano H1N1 para generar el subtipo H1N2 “tipo humano” (H1_{hu}N2) (3,40). Estos tres subtipos circularon con una relativa estabilidad en los países europeos hasta la aparición del virus pandémico H1N1 (H1N1pdm) de origen porcino. H1N1pdm se generó tras múltiples recombinaciones y está constituido por genes de origen porcino, humano y aviar (41). Esta última pandemia de Influenza A, que afectó tanto a humanos como a cerdos se denominó “gripe porcina” en referencia a su origen porcino. Los cerdos fueron muy susceptibles a este virus humano de origen porcino y la diseminación continuada en la población porcina se demostró en la mayoría de países productores de cerdos de Europa (25,31).

De este modo, entre los cerdos europeos circulan cuatro subtipos víricos, aunque su presencia relativa y nivel de incidencia pueden variar entre países. Actualmente, el subtipo H1_{av}N1 es el dominante, seguido del H1_{hu}N2, y en menor medida, H3N2 y H1N1pdm (3). Sin embargo, la continua co-circulación de los diferentes subtipos víricos en cerdos europeos y la presencia del nuevo subtipo H1N1pdm conllevó el aumento de eventos de reordenación, y la aparición de nuevos subtipos, como el virus H1_{pdm}N2, aunque no todas las reordenaciones descritas lograron establecerse en la población porcina (25,42).

La continua monitorización de las poblaciones porcinas en Europa es esencial para seguir la evolución del SIV en nuestro continente (13,42,43). Dicho virus puede jugar un papel

importante en la formación de virus pandémicos en humanos, tal como ocurrió con la aparición del virus H1N1 pandémico (3,31). El proyecto ESNIP3, que tuvo lugar desde 2010 a 2013 en Europa, demostró que el linaje pandémico del IAV estaba presente en varios países europeos, y en particular con una elevada prevalencia en Gran Bretaña e Irlanda (42,44).

2.6. Patogénesis

En el ganado porcino, todos los animales independientemente de su edad son susceptibles a la infección por el virus de la Influenza A, en los que producen una enfermedad respiratoria aguda, atacando e infectando las células epiteliales del tracto respiratorio de estos animales (45). Sin embargo, la sintomatología clínica es menos pronunciada en el caso de cerdos lactantes con anticuerpos maternos o cerdas madre previamente vacunadas (46,47).

La infección por el virus de la Influenza A causa un cuadro respiratorio que cursa con fiebre, letargia, tos, anorexia, disnea y en algunos casos, puede llegar a causar repeticiones acíclicas, y tormentas de abortos en hembras gestantes, debido a la fiebre (6). El daño respiratorio inicial se agrava con la presencia de patógenos secundarios, dando lugar a formas más graves de la enfermedad que pueden llegar a provocar una neumonía severa, y, en última instancia, desencadenan la muerte del animal infectado (Figura 5) (48–50).



Figura 5. Bronconeumonía craneoventral en un pulmón de cerdo infectado por el virus de la Influenza A. Imagen modificada de Janke B. H. (50).

Tras la introducción del virus en una explotación susceptible, la población presente en la granja desarrollará una inmunidad (innata y adaptativa) que la protegerá frente a esa misma cepa, propiciando el cese de la infección y evitando que esta pueda repetirse (27,51). Sin embargo, no existe un umbral de inmunidad absoluta para la infección por el virus de la gripe porcina (SIV), y, por tanto, los cerdos con inmunidad suficiente para prevenir la clínica todavía pueden ser infectados y excretar virus (52). Por otro lado, los brotes de gripe porcina tienden a

alcanzar su punto máximo en las estaciones de otoño e invierno, aunque se ha visto que en grandes instalaciones de producción porcina con un flujo continuo de cerdos de diferentes edades la infección por gripe endémica puede estar presente durante todo el año (45,50).

2.7. Diagnóstico

El virus de la Influenza A puede ser detectado en las secreciones nasales entre 1 y 3 días tras la infección, y su excreción suele durar entre 5 y 7 días, mostrando picos de carga vírica entre el tercer y quinto día de infección (45). Son muchos los factores que hacen que el virus de la Influenza A sea difícil de diagnosticar, entre ellos, su compleja ecología, su corto periodo de excreción y la presencia de otros patógenos causantes de enfermedad respiratoria (53). Para poder abordar el diagnóstico, es muy importante actuar con la mayor brevedad posible desde la aparición de los signos clínicos; en el caso de que los haya; y establecer unas buenas pautas de muestreo, en función de lo que se quiera detectar (27,54).

El diagnóstico clásico del virus de la gripe porcina se ha basado en el aislamiento del patógeno en cultivo celular, y la determinación serológica del subtipo por técnicas como la inhibición de la hemaglutinación (HI) (53,55). El cultivo del virus permite una caracterización detallada de las nuevas cepas, así como una monitorización de la sensibilidad a medicamentos antivirales y una vigilancia de la deriva antigénica. Sin embargo, tiene como desventaja el ser una técnica laboriosa y usualmente con baja sensibilidad (14).

En la actualidad, la técnica más común para la detección directa del virus de Influenza A es la PCR a tiempo real (RT-qPCR). Esta técnica es la más utilizada actualmente en la mayor parte de los laboratorios debido a que se trata de una prueba molecular altamente sensible y específica (14). Además, permite determinar de forma rápida el o los subtipos de virus implicados en una explotación afectada. Cabe resaltar que a la hora de tomar las muestras para la detección virológica, esta debe realizarse durante la etapa de excreción viral, unos días después de la aparición de la sintomatología, y debe restringirse a aquellos animales con signos clínicos claros (27,53).

Por el contrario, la detección indirecta de anticuerpos contra la Influenza A debe realizarse después de la eliminación del virus, alrededor de las 2-3 semanas post-infección. Una vez obtenido el suero, es posible realizar una prueba ELISA para confirmar la exposición al virus, la respuesta a la vacunación, o la presencia de anticuerpos maternos en el caso de lechones neonatales o destetados. Esta prueba no diferencia entre subtipos virales, como sí que lo hace la técnica de inhibición por hemaglutinación (HI). Sin embargo, esta última técnica tiene como

inconvenientes que el grado de reacción dependa de la similitud entre la cepa de referencia empleada en el diagnóstico y la presente en la muestra, y que exista cierta reacción cruzada entre los distintos subtipos (27,53).

En ocasiones, el virus de la Influenza A llega a causar lesiones pulmonares, provocando la muerte del animal; sin embargo, siempre debe confirmarse el diagnóstico con la detección del virus mediante PCR o inmunohistoquímica (IHC) en los tejidos afectados; así como con un buen diagnóstico diferencial de otros agentes causantes de problemas respiratorios (48,55).

En general, la influenza porcina no es una enfermedad fácil de detectar, siendo imprescindible invertir un cierto tiempo en la selección de los animales a muestrear, y utilizar protocolos específicos para la toma y análisis de muestras. En ocasiones, es necesario combinar varias técnicas, detectando el virus y comprobando la seroconversión de los animales afectados (53,56).

2.8. Vacunas

La naturaleza segmentada del virus de la Influenza A, y su capacidad de reordenamiento ha generado dificultades en cuanto al desarrollo de vacunas eficaces para prevenir y controlar la gripe porcina, debido a que una sola vacuna estandarizada no se adecua a la situación epidemiológica de todas las explotaciones por la gran variabilidad de subtipos virales existentes. A pesar de esto, el uso de las vacunas comerciales es actualmente la mejor estrategia para prevenir la enfermedad. Normalmente, se vacunan a las cerdas para generar anticuerpos maternos que sean transferidos a sus camadas vía calostro, aunque en ocasiones también se vacunan los cerdos de engorde (57,58).

A día de hoy, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios ha autorizado la comercialización de 4 vacunas frente a la gripe porcina: Gripork, Suipravac-ad/coli/flu, RespiporcFlupan H1N1, y Respiporc Flu3. Todas ellas contienen cepas inactivas del virus de la Influenza A, pero tan sólo la última protege frente a los tres subtipos enzoóticos europeos circulantes en la población porcina (H1N1, H1N2 y H3N2) (59).

La vigilancia y la monitorización de las cepas circulantes de los virus de la Influenza A se encuentran en la base del desarrollo y selección de nuevas vacunas. Para lograr esa monitorización, es necesaria la caracterización antigénica en combinación con la secuenciación y la información epidemiológica (27).

La última pandemia de 2009 demostró que los virus de la gripe son patógenos zoonóticos importantes y nos enseñó que la vigilancia de los virus de la Influenza A en los cerdos y también en las aves, es necesaria para prevenir y controlar futuras pandemias. Está claro que la vacuna no es una herramienta perfecta y que el virus de la gripe la está desafiando constantemente, pero es la mejor opción de protección. El objetivo a largo plazo tanto en sanidad humana como en producción animal es el desarrollo de una vacuna universal que ofrezca inmunidad segura, efectiva, de mayor duración y contra cualquier subtipo o cepa del virus (45,57,58).

3. OBJETIVOS

El presente estudio analiza la situación epidemiológica actual del virus de la Influenza A en porcinos procedentes de distintas provincias del territorio nacional. El objetivo general es, por tanto, identificar y evaluar las relaciones filogenéticas de los distintos subtipos de SIV que circularon en la cabaña porcina española durante el año 2020. Para ello, los objetivos concretos son:

1. Determinar el subtipo de los genes HA y NA del virus de la Influenza A, mediante ensayos de transcriptasa reversa a tiempo real (RT-qPCR), en muestras porcinas positivas a este agente y recibidas por el laboratorio de Exopol durante el año 2020.
2. Secuenciar los genes HA y NA de cepas circulantes, para corroborar el subtipado realizado por RT-qPCR y hacer comparaciones de las secuencias nucleotídicas.
3. Evaluar la diversidad genética de los SIV circulantes a día de hoy en la cabaña porcina del territorio español.

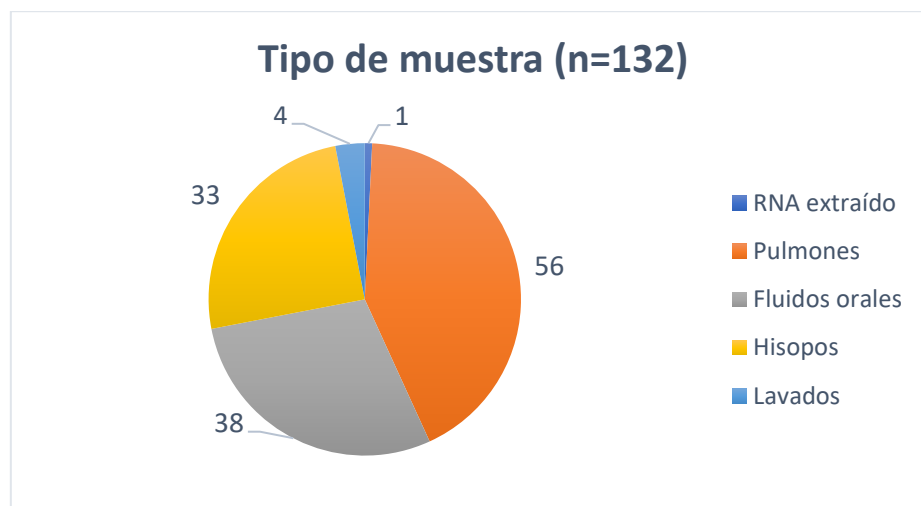
4. METODOLOGÍA

4.1. Selección y clasificación de las muestras: casos clínicos

Durante el año 2020, el laboratorio de diagnóstico veterinario Exopol contabilizó un total de 407 casos clínicos de porcino positivos al virus de la Influenza A mediante un ensayo de RT-qPCR. El ácido nucleico de todas estas muestras positivas fue almacenado a -80°C para un posterior uso. Para la realización del presente estudio solo se seleccionó aquellas muestras con un valor de ciclo umbral o ciclo de cuantificación (Cq) menor que 32. La elección de este valor no fue azarosa, sino que recae en el hecho de que las muestras con un valor Cq mayor de 32 son consideradas positivas débiles por la poca carga viral que poseen y podrían dar lugar a falsos negativos en los ensayos de determinación de subtipo. Tras la selección, se incluyeron un total de 132 muestras para el estudio de subtipado (Tabla A1.1. de *Anexo D*). El estudio

realizado fue de tipo retrospectivo, y descriptivo en función de la información recibida por parte del veterinario y/o ganadero en cada caso.

Todas las muestras seleccionadas (n=132) procedían de animales que mostraban algún tipo de patología respiratoria, y fueron recibidas por el laboratorio en el área destinada a necropsias en donde se les asignó un número de caso clínico. El 55,3% de las muestras fueron agrupadas en *pools* (n=73), y el 44,7% de las muestras fueron evaluadas de forma individual (n=59); el análisis de las muestras en grupo o en individual fue realizado en base al criterio de cada cliente. En cuanto al tipo de muestra, casi la mitad de ellas eran pulmones (42%), un 29% fueron fluidos orales, un 25% fueron hisopos y el restante 3% fueron lavados bronquioalveolares (Gráfica 1) (Tabla A1.1. de *Anexo I*). Es necesario indicar que los fluidos orales (FO) al ser considerados de por sí como una muestra de *pool*, se evaluaron siempre de forma individual.



Gráfica 1. Distribución del número de muestras seleccionadas en función del tipo (n=132). La muestra 79 fue enviada como RNA previamente extraído.

Con respecto al origen de las muestras, se incluyeron casos clínicos de explotaciones ganaderas ubicadas en un total de 22 provincias diferentes en el territorio español (Tabla A1.1. del *Anexo I*). Como se observa en la Tabla 2, un buen porcentaje de las muestras (62%) procedían de las comunidades autónomas de Aragón (n=55) y Cataluña (n=28), la principal zona de influencia del laboratorio y al mismo tiempo zonas de gran producción porcina intensiva a nivel nacional. También se evaluaron muestras de otras 15 provincias en 8 comunidades autónomas diferentes.

Por otro lado, las muestras fueron clasificadas en tres grupos en función de la fase del ciclo productivo en la que se encontraba el animal. El primer grupo (n=12) correspondía al periodo de lactancia (hasta los 28 días de vida) en el cual el lechón permanece con la madre; el segundo

grupo (n=61) eran los animales del periodo de transición en el que los lechones permanecen entre 7 y 8 semanas tras producirse el destete; y el último grupo (n=33), son los animales en periodo de crecimiento y cebo, donde llegan con una edad aproximada de 11 semanas y permanecen hasta que son enviados al matadero con un peso aproximado de 120kg. La razón por la cual se hizo esta división se explicará más adelante, en el apartado 5.1 de resultados y discusión. Por otra parte, 4 muestras procedían de cerdas madre (3%) y en 22 de ellas (17%) se desconocía la fase del ciclo productivo en la que se encontraba el animal (Tabla A1.1. del *Anexo D*).

Tabla 2. Procedencia de los casos clínicos positivos a Influenza A evaluados en este estudio.

PROCEDENCIA DE CASOS CLÍNICOS			
Comunidad autónoma	Provincia	Nº total de casos por provincia	Nº total de casos por Comunidad Autónoma
Andalucía	Almería	2	15
	Cádiz	2	
	Málaga	11	
Aragón	Huesca	20	55
	Zaragoza	26	
	Teruel	9	
Castilla-La Mancha	Albacete	1	5
	Toledo	4	
Castilla y León	Ávila	4	12
	Segovia	6	
	Soria	1	
	Valladolid	1	
Cataluña	Barcelona	16	28
	Gerona	2	
	Lérida	9	
	Tarragona	1	
Comunidad Foral de Navarra	Navarra	3	3
Comunidad Valenciana	Castellón	1	3
	Valencia	2	
Extremadura	Badajoz	4	4
Galicia	Pontevedra	1	1
Región de Murcia	Murcia	6	6

4.2. Procesamiento de muestras biológicas y extracción de ácidos nucleicos.

El material biológico recibido (pulmones, fluidos orales, hisopos o lavados) fue transferido al área de extracción de ácidos nucleicos en donde se realizó un pre-tratamiento de cada muestra, siguiendo el protocolo normalizado de trabajo (PNT) instaurado en el laboratorio y con el fin de facilitar la extracción del RNA en muestras de origen diverso.

Brevemente, todas las muestras fueron homogeneizadas en tubos Eppendorf con perlas de zirconio (1mm diámetro) usando el equipo MagNaLyser Roche (6000 rpm x2, 30s), y luego centrifugadas (1000rpm 2min), para posteriormente llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos con un robot automático de extracción KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) y el respectivo kit MagMAX™ CORE NucleicAcid Purification (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El método de extracción está basado en la tecnología de perlas magnéticas, que consiste en la adhesión del DNA/RNA de las muestras a las perlas, las cuales a su vez se pegan a un imán del robot que transfiere todo el complejo (perlas-DNA/RNA) a varias placas con tampones de lisado/lavado. Tras estas etapas sucesivas de lavados, se consigue extraer completamente los ácidos nucleicos (DNA/RNA) de cada muestra.

4.3. Ensayo general de RT-qPCR para la detección del virus de la Influenza A.

El RNA extraído se transfirió al área de amplificación en donde se realizó una RT-qPCR usando el kit comercial EXOone INFA oneMIX (Exopol) para evaluar la presencia o ausencia de este agente. Este kit contiene todos los reactivos necesarios para realizar la RT-qPCR, incluido un control positivo cuantificado. El tubo oneMIX contiene las enzimas, los dNTPs, el buffer de reacción, y los cebadores y sondas Taqman necesarios para la detección específica del virus de la Influenza A (canal FAM), así como para un control endógeno (canal HEX). El ensayo de Influenza A utiliza como diana una región del gen M, el cual ha sido descrito como muy conservado entre los diferentes subtipos virales del género de *Influenza A*. El protocolo térmico utilizado se indica en la Tabla 3. El kit comercial presenta un límite de detección de 50 copias de equivalente genómico/reacción y considera negativas a aquellas muestras con un Cq mayor de 38.

Tabla 3. Protocolo térmico utilizado en la RT-qPCR para ensayo general de la Influenza A.

Nº Ciclos	Temperatura(°C)	Tiempo	Etapa
1	45	15 min	Retrotranscripción del RNA a cDNA
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
	95	15s	Desnaturalización de DNA
42	60	1min	Hibridación de cebadores. Lectura de fluorescencia.

Una vez procesadas, todas las muestras fueron correctamente almacenadas en los biobancos de Exopol a -80°C para su posible posterior uso.

4.4. Identificación molecular de los subtipos del virus de la Influenza A

4.4.1. Subtipado de los genes HA y NA mediante ensayos de RT-qPCR

La determinación molecular del subtipo del virus de la Influenza A fue realizada utilizando un protocolo descrito previamente por Henritzi y col. en 2016 (60), que consta de 7 ensayos de RT-qPCR para diferenciar los distintos subtipos de HA y NA descritos en porcino. Estos ensayos fueron diseñados para la detección y diferenciación de 4 subtipos de hemaglutinina: H1aviar (H1av), H1humano (H1hu), H1pandémico (H1pdm) y H3; y de 3 subtipos de neuraminidasa: N1, N2 y N1pandémico (N1pdm). Las secuencias de los oligos y cebadores se describen en la Tabla 4. Todos los oligos y sondas (marcadas con el fluoróforo FAM) utilizadas en esta parte del estudio fueron sintetizadas por la casa comercial Integrated DNA Technologies (IDTdna).

Durante el estudio se tuvo que re-diseñar el ensayo para la identificación del subtipo H3 descrito por Henritzi (60), pues se observó que este presentaba una baja similitud con algunas secuencias de este tipo obtenidas en nuestro país. Por estos motivos, se procedió a desarrollar un nuevo ensayo de RT-qPCR para la identificación del subtipo H3 que incluyera estas variantes. Debido al carácter confidencial de esta información, las secuencias de este nuevo ensayo no se pueden mostrar en el presente trabajo.

Tabla 4. Cebadores y oligos descritos por Henritzi para el subtipado del virus de Influenza A por RT-qPCR (60).

HA	Cebador/Sonda	Concentración	Secuencia	Localización	Secuencia de referencia
	H1av_Sw_Fw	20 pmol/rxn	gaaggrggatggacaggratra	1063–1084	A/swine/Germany/SI V04/2008 (H1N1)

<u>H1av</u>	H1av_Sw_Rv1	10 pmol/rxn	actgagtcactttgtrytk	1176–1196	FN429078
	H1av_Sw_Rv2	10 pmol/rxn	caattahtgartcactttgttgy	1178–1201	
	H1av_Sw_P	2,5 pmol/rxn	tctggttaygcagcwgatmagaaaa	1126–1150	
<u>H1hu</u>	H1hu_Sw_Fw	10 pmol/rxn	ggatggtacggttaycayca	1090–1109	A/swine/Kitzen/IDT6 142/2007 (H1N2) GQ161145
	H1hu_Sw_Rv	10 pmol/rxn	tttcgatcacagaattcacct	1184–1204	
	H1hu_Sw_P	2,5 pmol/rxn	cagggwtctgghtatgctgcdgacc	1120–1144	
<u>H1pdm</u>	H1pdm_Fw	10 pmol/rxn	ctagtgtaccgagatatgca	793–813	A/Germany- MV/R26/2011 (pdmH1N1) EPI356430
	H1pdm_Rv	10 pmol/rxn	tattgcaatcgtggactggtgt	859–880	
	H1pdm_P	1 pmol/rxn	cgcaatggaaagaaatgctggatctgg	816–842	
<u>H3</u>	H3_Sw_Fw	10 pmol/rxn	ggggaccctcaytgta	262–278	A/swine/Bakum/8602 /99 (H3N2) EF409250
	H3_Sw_Rv	10 pmol/rxn	actcyggcactcatahgg	343–361	
	H3_Sw_P	2,5 pmol/rxn	ttgaacgcagcarrgcttcagca	311–334	
NA	Cebador/ Sonda	Concentr- ación	Secuencia	Localizaci- ón	Secuencia de referencia
<u>N1</u>	N1_Fw	12,5 pmol/rxn	agrccttyttctgggttga	1255–1274	A/swine/Germany/SI V04/2008 (H1N1) FN429079
	N1_Rv	12,5 pmol/rxn	accgtctggccaagacca	1363–1380	
	N1_P	1,5 pmol/rxn	atytgacyagtgaggagcagcat	1306–1328	
<u>N1pdm</u>	N1pdm_Fw	10 pmol/rxn	caacacttgggtaaatcaga	174–193	A/Germany- MV/R26/2011 (pdmH1N1) EPI356429
	N1pdm_Rv	10 pmol/rxn	cggaaaccactgactgtc	230–247	
	N1pdm_P	2,5 pmol/rxn	catcagcaacaccaactttgctgct	204–228	
<u>N2</u>	N2_Fw	15 pmol/rxn	agtctggtggacycaayag	1305–1325	A/swine/Bakum/8602 /99 (H3N2) EF409258
	N2_Rv	15 pmol/rxn	ttgcgaaagcttatatagvcatga	1397–1420	
	N2_P	2,5 pmol/rxn	ccatcagccatgagcctgwwccata	1357–1382	

La RT-qPCR fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Henritzi (60) y utilizando los reactivos del kit comercial de amplificación SensifastProbe no ROX onestep (Bioline). El volumen final de reacción fue de 20µl e incluía 5µl de RNA, 10 µL de Mastermix SensiFAST™ (2X), 3,4 µL de agua molecular libre de DNAsas, 0,2 µL de enzima transcriptasa reversa, 0,4 µL de inhibidor de RNAsas y los respectivos cebadores y sondas a una concentración final de 500nM, y 250nM respectivamente. En cada carrera de RT-qPCR se incluyó el respectivo control positivo (IAHN; secuencia de DNA sintético) y control negativo; y la reacción de amplificación fue realizada en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) siguiendo el protocolo térmico que se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Protocolo térmico utilizado en las RT-qPCR para el subtipado de Influenza A.

NºCiclos	Temperatura(°C)	Tiempo	Etapas
1	45	20 min	Retrotranscripción del RNA a cDNA
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
42	95	30s	Desnaturalización de DNA
	58	1min	Hibridación de cebadores / Lectura de fluorescencia.
	72	30s	Elongación de la cadena.

Los resultados de la RT-qPCR fueron expresados en términos de Cq y se detallan en la Tabla A2.1. del *Anexo II*. El valor Cq hace referencia al número de ciclos requeridos para identificar una muestra como positiva, y es inversamente proporcional a la cantidad de material genético que existe en la muestra; mientras más bajo el Cq, mayor cantidad de material genético hay presente. Los resultados fueron analizados con el software correspondiente (7500 Software v2.3) y las muestras con un Cq superior a 40 en cada uno de los ensayos de subtipado se consideraron negativas. Como ya se indicó en el apartado 4.1, las muestras debían presentar un valor de Cq menor que 32 en el ensayo general para poder ser incluidas en el presente estudio.

4.4.2. Determinación del subtipo de los virus de la Influenza A mediante secuenciación Sanger.

4.4.2.1. Amplificación de los genes HA y NA mediante RT-PCR

Los genes HA y NA del virus de la Influenza A tienen un tamaño aproximado de 1701bp y 1410bp respectivamente. Considerando que la técnica de secuenciación Sanger carece de una capacidad de lectura adecuada para fragmentos mayores a 800bp-900bp, se procedió a utilizar protocolos descritos para secuenciar estos genes en dos fragmentos (región 5' y región 3').

En la siguiente tabla (Tabla 6) se describen las secuencias y respectivas referencias de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los genes HA y NA del virus de la Influenza A. Adicionalmente, a lo largo del estudio se procedió a realizar también unos diseños de ensayos propios para la obtención de las secuencias de HA y NA, en muestras en los que los oligos descritos previamente no funcionaron. Los cebadores fueron sintetizados por la casa comercial Integrated DNA Technologies.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes HA y NA.

Diana	Nombre del primer	Región	Secuencia	Tamaño del producto amplificado	Ref.
HA región 5'	SZAHA+	5'	5 -CTCGAGAGCAAAAGCAGGGG-3	1 kb	(1)
	HA1000Rv	5'	5 -GTGATGGGATGTACATTCTG-3		(61)
HA región 3'	H1exoFw	3'	Secuencia disponible bajo petición a la empresa	1 kb	Exopol
	HARk	3'	5- GTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3		(62)
NA región 5'	NA700Fw	3'	5-TGAGAACACAAGAGTCTGAATGTG- 3	0,8 kb	(61)
	NARk	3'	5 - GTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT- 3		(62)
NA región 3'	SZANA+	5'	5-AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATG-3	0,8 kb	(1)
	NA880Rv	5'	Secuencia disponible bajo petición a la empresa		Exopol

Para la RT-PCR se utilizaron los reactivos del kit comercial SensifastProbe no ROX onestep (Bioline), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, para realizar la mezcla de reacción se usaron 25µL de Master MixSensiFAST™ (2X), 3,5 µL de agua molecular libre de DNasas, 1 µL de inhibidor de RNasas, 0,5 µL de transcriptasa reversa y 2,5 µL de cada cebador (reverse y forward); y se añadieron 15 µL de RNA de la muestra para llegar a un volumen final de reacción de 50 µL por pocillo. Posteriormente, se procedió a la amplificación del material genético en un termociclador BioRad MiniOpticon™ Real-Time PCR System, siguiendo el protocolo térmico que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Protocolo térmico utilizado en la RT-PCR.

NºCiclos	Temperatura(°C)	Tiempo	Etapa
1	45	20 min	Retrotranscripción del RNA a cDNA
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
40	95	30s	Desnaturalización de DNA
	60	30s	Hibridación de cebadores
	72	1 min	Elongación de la cadena

4.4.2.2. Visualización de los productos de amplificación

La visualización de los productos amplificados fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa, preparados al 1,5% con tampón Tris-acetato-EDTA 1X y teñidos con bromuro de etidio (10mg/mL). En cada carril del gel se cargó 10 µL del producto amplificado mezclado con 2 µL de tampón de carga 5X (Ibiam Technologies); y para determinar el tamaño del producto se utilizaron dos marcadores de peso molecular, de 100bp y 1kb DNA Ladder Ready-to-use (Ibiam Technologies). La electroforesis se realizó a 100V durante 25 minutos y una vez terminada se procedió a la visualización de los geles con un equipo transiluminador con captura de imágenes (Vilber). Todas las bandas con el tamaño apropiado, aproximadamente 1kb para el gen HA y 0,8kb para el gen NA, y que adicionalmente no presentaran alguna otra banda inespecífica, se consideraron adecuadas y fueron guardadas para su posterior secuenciación.

4.4.2.3. Secuenciación y análisis filogenético

Un total de 68 muestras procedentes de diferentes provincias de España fueron seleccionadas para su secuenciación. El producto amplificado fue enviado para secuenciar a la empresa STAB VIDA mediante un equipo DNA 3500XL GeneticAnalyzer (Applied Biosystems); y fue realizada en ambos sentidos con los mismos cebadores utilizados para la amplificación del producto.

Los archivos de secuenciación obtenidos (.abi) fueron evaluados haciendo uso de varias herramientas bioinformáticas de acceso libre en Internet. En primer lugar, se procedió a comprobar la calidad y luego realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas con los cebadores directo (*forward*) e inverso (*reverse*) mediante los programas de Chromas 2.6.6 y Ugene, respectivamente. La secuencia revisada fue guardada en formato FASTA y luego analizada mediante la herramienta BLASTn, con el fin de obtener la información de secuencias relacionadas con mayor similitud nucleotídica, depositadas en la base de datos del Genbank.

Las secuencias de referencia para cada tipo de hemaglutinina (H1av, H1hu, H1pdm y H3), y de neuraminidasa (N1, N1pdm y N2) se seleccionaron a partir de los resultados de filogenia publicados hasta el momento sobre SIV, con especial atención al trabajo realizado por Sosa Portugal en el año 2021, y desde la base de datos GenBank. Estas secuencias de referencia procedían principalmente de España, aunque también se seleccionaron secuencias procedentes de países del norte de Europa como Dinamarca, Alemania y Países Bajos, debido a que la mayoría de cerdas madre de granjas españolas provienen de estos países. Adicionalmente, se seleccionaron secuencias de referencia de cepas virales identificadas en España en diferentes momentos temporales: recientemente en los años 2019, 2018 y 2017, hace aproximadamente una década, y a comienzo del siglo XXI. La lista de las secuencias de referencia utilizadas en el presente estudio se detalla en la Tabla A3.1. del *Anexo III*.

La construcción de los árboles filogenéticos, se hizo utilizando el software MAFFT 7 para realizar, en primer lugar, un alineamiento múltiple de las secuencias objeto de estudio y las secuencias de referencia. Tras el alineamiento, se procedió a construir el árbol filogenético utilizando el método Neighbor-joining y realizando un número de repeticiones *bootstrap* n=1000. La visualización y edición del árbol filogenético fue realizada mediante el programa Archaeopteryx.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Identificación molecular del virus de la Influenza A en los casos clínicos: tipos de muestra y fases del ciclo productivo.

Durante el año 2020, el laboratorio de Exopol registró un total de 1250 casos clínicos de porcinos relacionados con algún tipo de patología respiratoria. La presencia del virus de la Influenza A fue identificada en el 33 % (407/1250) de estos casos, mediante un kit comercial de RT-qPCR con cebadores específicos para el gen de la matriz (gen M) y sondas TaqMan (EXOone Influenza A virus, Exopol). El uso de esta diana es relativamente común en la mayoría de estudios basados en la detección de este agente por RT-qPCR, esto se debe a que el gen M es menos variable en comparación con otros segmentos genéticos de este virus; de hecho, dentro de la secuencia de codificación M1 del segmento 7, se identificaron varias regiones (posiciones 32 a 93, 149 a 204 y 218 a 276) relativamente conservadas entre cepas del virus de la gripe A obtenidas de diferentes hospedadores y de diferentes regiones geográficas (30).

Para realizar el presente estudio se incluyeron 132 de estos casos clínicos positivos a Influenza porcina y procedentes de 22 provincias españolas. Aunque el 42% (56/132) de las

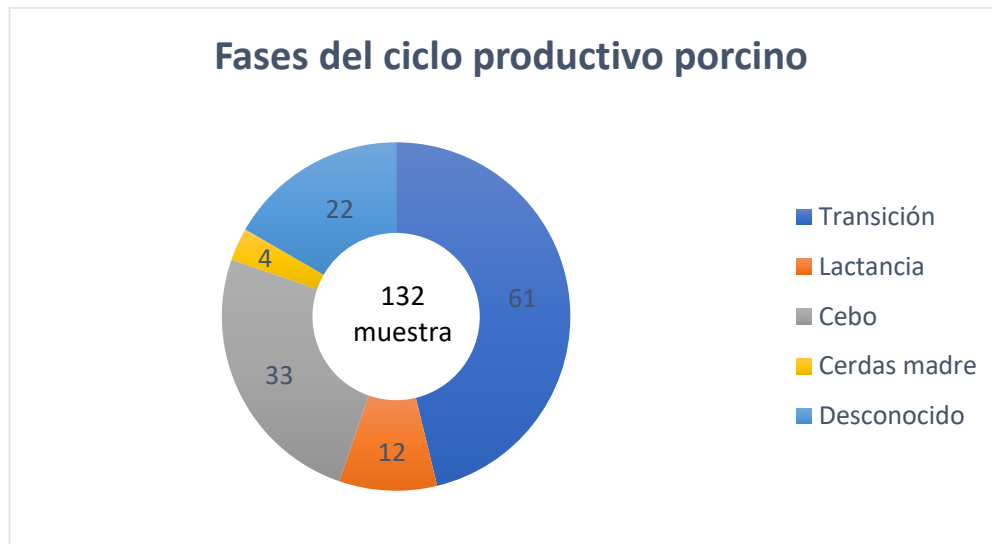
muestras fueron tejidos de animales muertos, el restante 58% fue de muestreo “in vivo”. El uso de hisopados nasales es común para la identificación y el aislamiento viral cuando existen signos clínicos evidentes en los animales. Sin embargo, este tipo de muestreo requiere la recogida individual en un número suficiente de animales como para representar a la población total durante la fase de infección. Si no se observa clínica evidente, otra aproximación posible al diagnóstico de este agente es la monitorización periódica mediante fluidos orales, la cual ha demostrado ser un excelente método de muestreo para determinar donde y cuando circula el virus (63).

Los primeros reportes de gripe porcina en el continente europeo datan del año 1976 (64). En España, sin embargo, este virus fue detectado por primera vez algunos años más tarde, en 1982 (65). Desde entonces, el virus de la Influenza A viene circulando entre las poblaciones porcinas de casi todos los países de Europa occidental (66–71), despertando gran interés en la comunidad científica; tanto es así, que durante los años 2000 a 2013, se llevaron a cabo los proyectos europeos ESNIP, que tenían por objetivo la vigilancia del virus de la Influenza A en las poblaciones porcinas europeas. El último proyecto, el ESNIP 3, concluyó que más del 30% de las granjas porcinas europeas eran seropositivas a este agente (44). Más recientemente, un estudio realizado entre 2015 y 2018 utilizando un ensayo de RT-qPCR para el gen de la matriz (M), reveló que el 56,6% de las explotaciones porcinas europeas estaban infectadas por el virus de la Influenza A. Este porcentaje variaba notablemente entre países en función de la actividad de producción porcina, alcanzando en torno al 70% de las explotaciones positivas al SIV en países como España, Países Bajos o Dinamarca. Por otro lado, también se indicaba que el 32% (260/791) de las muestras procedente de porcinos con sintomatología respiratoria en España eran positivos al SIV (72); un porcentaje muy similar al encontrado en nuestro estudio.

Actualmente las granjas porcinas intensivas establecen un sistema de producción en fases; es por este motivo que las muestras analizadas en este estudio, fueron clasificadas según el momento del ciclo productivo en que se encontraba el animal: lactancia, transición y cebo ó engorde. La mayoría de nuestras muestras positivas, un 46% (61/132), procedían de cerdos en la fase de transición; el siguiente grupo con más índice de positividad fue el de cebo con un 25% (33/132) de muestras positivas, seguido de los lechones lactantes con un 9% (12/132). También se detectó el SIV en 4 muestras procedentes de cerdas reproductoras (Gráfica 2).

La presencia de un alto porcentaje de animales positivos en transición podría deberse a que estos animales llegan a esta fase tras el destete, el cual es un momento crítico en la vida del

cerdo que ocasiona un estado de *stress* en el animal y cierto grado de inmunosupresión (73). Un estudio de caracterización de subtipos del SIV llevado a cabo en granjas españolas entre 2017 y 2019 encontró una distribución similar de muestras positivas (gen M, RT-qPCR) en función de los grupos de edad de los animales. En ese estudio, el 37% (53/145) de las muestras positivas procedían de cerdos en transición, un 18% (26/145) fueron tomadas de lechones lactantes y un 15% (22/145) de cerdos en la fase de engorde (24).



Gráfica 2. Distribución de las muestras del estudio según la fase del ciclo productivo: lactancia, transición y cebo. También se incluyen muestras procedentes de cerdas madre o de estatus desconocido.

Es interesante resaltar, que varios estudios han demostrado que los anticuerpos derivados de la madre no necesariamente evitan la infección por el SIV en los lechones, sino que reducen la presentación de la sintomatología clínica (46,47,74). Adicionalmente, también se ha descrito que los lechones con inmunidad materna homóloga transmiten en menor proporción el SIV en comparación con aquellos seronegativos o con inmunidad materna frente a otras cepas virales; siendo estos últimos, altamente susceptibles posteriormente en las fases de transición y engorde. Por otro lado, las cerdas de reposición son una población susceptible a la infección, y se ha estudiado que las camadas provenientes de estas cerdas tienen un riesgo relativo mayor de ser positivas en la maternidad que las camadas de cerdas multíparas (75,76).

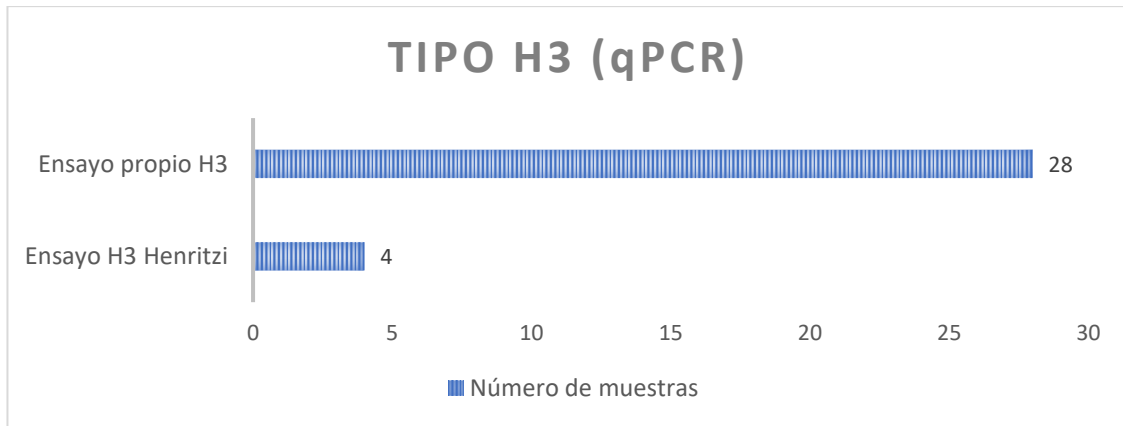
Diferentes estudios longitudinales, han concluido que la infección por el virus de la gripe en cerdos es un proceso más complejo de lo que se creía anteriormente, pudiendo presentar diferentes patrones (20,56,77), desde un brote epidémico que afecta a todos los animales de la explotación sin diferenciar la fase productiva en la que se encuentren, hasta una forma endémica con diferentes oleadas de infecciones con menor incidencia.

5.2. Determinación del subtipo del virus de la Influenza A mediante RT-qPCR.

Como se menciona en el apartado 2.3, los subtipos del virus de la Influenza A se designan de acuerdo a las características genéticas y antigénicas de las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).

Con el fin de realizar el subtipado se utilizó una serie de ensayos de RT-qPCR previamente descritos por Henritzi y col. (60), así como un diseño propio, en un total de 132 muestras positivas a Influenza A. El subtipado de ambos genes se obtuvo en el 94% (124/132) de las muestras, mientras que en el restante 6% (8/132) solo se pudo subtipar uno de los dos genes. El subtipado del virus de la Influenza A suele ser complicado, ya que los genes HA y NA al estar en continua evolución son altamente variables, y los cebadores y sondas de los ensayos pueden llegar a presentar baja similitud con las secuencias genéticas de las nuevas variantes. En un estudio publicado en febrero de 2020 por Sosa y col. sobre subtipado de casos de Influenza porcina en la península ibérica, estos investigadores sólo lograron subtipar por RT-qPCR un total de 94 muestras de 145 evaluadas (24). El protocolo de RT-qPCR utilizado en ese estudio fue también el descrito previamente por Henritzi y col. en 2016 (60).

El alto porcentaje de muestras subtipadas en nuestro estudio se logró gracias al uso de un nuevo ensayo de qPCR para el tipo H3. El ensayo descrito previamente por Henritzi (60) sólo identificó 4 muestras positivas para este tipo; pero nuestros datos preliminares de secuenciación indicaban que había más casos positivos. Esto nos llevó a diseñar un nuevo ensayo que presentara mayor similitud con las nuevas secuencias H3 obtenidas. Así pues, el número final de muestras identificadas como H3 con el nuevo ensayo alcanzó un total de 28 casos (Gráfica 3). En la Tabla A2.1. del *Anexo II* se muestran los valores de Cq obtenidos en las muestras con ambos ensayos H3. Todas las muestras que fueron positivas con el ensayo descrito por Henritzi también lo fueron con el nuevo ensayo, obteniéndose además valores de Cq mucho más bajos con este último, y confirmando, por tanto, que esas muestras eran del tipo H3 del virus de la Influenza A (Gráfica A2.2. del *Anexo II*).



Gráfica 3. Número de muestras identificadas como tipo H3 con el ensayo descrito por Henritzi y con el ensayo propio creado para este trabajo (n=132).

De las 124 muestras en las que se logró realizar el subtipado del virus de la Influenza A, el 81% (101/124) eran positivas a un único subtipo; mientras que en el 19% (23/124) restante se encontró una co-infección de varios subtipos virales. La existencia de co-infección en el porcino es habitual porque actúan como “recipientes de mezcla”, y se ha descrito en estudios previos de muchos países, incluido el nuestro (24,76,78,79). Esto es posible porque esta especie animal presenta en su tracto respiratorio receptores de tipo α -2,3 y α -2,6 que le hacen susceptible a infecciones por virus de origen aviar y humano. Por otro lado, el tipo de muestra también puede influir en la detección por RT-qPCR de más de un subtipo viral; las muestras que son un *pool* de varios animales tienen una mayor probabilidad de contener varios subtipos de la Influenza A frente a las muestras individuales.

En Europa se pueden diferenciar tres linajes distintos del tipo H1 (aviar, humano y pandémico) y dos del N1 (aviar y pandémico) para el SIV; sin embargo, para los tipos H3 y N2 no se han descrito linajes hasta el momento. En el caso de las HA identificadas en nuestro estudio, el principal linaje fue el H1 aviar seguido del H1 humano, en un 60% y 26% de las muestras respectivamente. El tipo H3 se identificó en el 22% de las muestras, y sólo 13 casos fueron positivos al ensayo de H1 pandémico. En lo referente a los tipos del gen NA, el 73% de los casos fueron clasificados como N2 y el restante 34 % como N1; de este último, tres casos fueron positivos también para el ensayo de N1 pandémico (Tabla 8).

Tabla 8. Identificación del subtipo del virus de Influenza A mediante RT-qPCR. La suma de los casos positivos para las HA y NA es mayor al número total de muestras (n=124) debido a la presencia de co-infección en alguna de las muestras.

TIPO DE HA			TIPO DE NA		
H1 AVIAR	74 muestras	60% (74/124)	N1	42 muestras	34% (42/124)
H1 HUMANO	32 muestras	26% (32/124)	N1 PANDÉMICO	3 muestras	2% (3/124)
H1 PANDÉMICO	13 muestras	10% (13/124)	N2	90 muestras	73% (90/124)
H3	28 muestras	23% (28/124)			

La combinación de un tipo de HA con un tipo de NA es lo que define a lo que conocemos como subtipo viral. En nuestro estudio, el subtipo más frecuente fue el H1_{av}N2, el cual se identificó en un total de 44 muestras. El subtipo H1_{hu}N2 fue el segundo más frecuente con 16 muestras positivas a esta combinación. Los subtipos H1_{av}N1, H3N1 y H3N2 se identificaron en las muestras en una proporción similar, con 10, 11 y 10 muestras respectivamente. Por último, las muestras que habían sido infectadas por virus de subtipo H1_{pdm}, N1_{pdm} o con ambos genes de origen pandémico (H1_{pdm}N1_{pdm}) fueron los menos comunes, tal como se aprecia en Tabla 9.

La distribución de subtipos y linajes obtenida en nuestro estudio se asemeja a los resultados publicados recientemente por Sosa Portugal (24) en porcinos de la península ibérica; y en donde los subtipos virales más comunes fueron el H1_{av}N2_{hu} (33.6%), H1_{av}N1_{av} (24.3%) y H1_{hu}N2_{hu} (18.7%). Es interesante resaltar que la situación epidemiológica de los SIV ha cambiado notablemente en nuestro país en las últimas décadas. Desde comienzos de siglo, cuando se evidenció por primera vez la co-circulación de los tres virus de la Influenza A enzoóticos europeos en la cabaña nacional (80), los estudios publicados identificaban al subtipo H1_{av}N1 como el más prevalente, tanto a nivel Europeo como en España (19,44,56,61). De hecho, un estudio reciente de vigilancia de gripe porcina, llevado a cabo entre 2015-2018 en 17 países europeos, determinó que este subtipo seguía siendo el predominante, afectando a un 39,2% (998/2.547) de las granjas evaluadas (72). En este mismo estudio, el subtipo H1_{hu}N2 fue identificado en el 11,4% de las granjas europeas muestreadas y el H1_{av}N2 en el 12,6% de ellas (44).

Tabla 9. Distribución de los subtipos virales de SIV identificados en el estudio mediante el uso de ensayos de RT- qPCR (n=101).

SUBTIPOS VIRALES		
H1avN2	44	43% (44/101)
	muestras	
H1huN2	16	16% (16/101)
	muestras	
H1avN1	10	10% (10/101)
	muestras	
H3N1	11	11% (11/101)
	muestras	
H3N2	10	10% (10/101)
	muestras	
H1pdmN1pdm	2	2% (2/101)
	muestras	
H1pdmN1	4	4% (4/101)
	muestras	
H1pdmN2	4	4% (4/101)
	muestras	

En algunos países como Dinamarca el subtipo H1_{av}N2 ha sido descrito como el más frecuente entre la población porcina (42,9%), algo similar a lo observado en nuestro estudio, en donde este subtipo fue identificado en el 43% de los casos evaluados, seguido del subtipo H1_{hu}N2 con el 16% de los casos. Por otro lado, el subtipo H3N2 es cada vez menos común en la cabaña porcina española al igual que ocurre en otros países (24,42,72). Cabe resaltar, que según un estudio serológico realizado en 2008-2009 en España, más del 90% de los cerdos evaluados fueron seropositivos al H3N2 (19). Se ha indicado que el descenso en la frecuencia relativa del H3N2 en los años posteriores podría estar relacionado con la aparición del subtipo H1N1pandémico y sus virus recombinantes en muchos países europeos, incluido España (42,81).

Desde 2009, la co-circulación del subtipo pandémico (H1_{pdm}N1_{pdm}) con los tres linajes de virus enzoóticos europeos H1_{av}N1, H1_{hu}N2, y H3N2 ha dado lugar a varios eventos de reordenamiento, lo que ha llevado a la detección de virus que han intercambiado principalmente los genes HA y/o NA (42,82). Entre los virus híbridos que se han formado desde entonces, encontramos al H1_{pdm}N2 y al H1_{pdm}N1 que se encuentran incrementando su prevalencia desde hace varios años en algunos países europeos (42). En nuestro estudio estos recombinantes del virus pandémico se han detectado en un total de 8 muestras (4 muestras H1_{pdm}N2 y 4 muestras H1_{pdm}N1). El virus de subtipo H1_{pdm}N2 fue detectado por primera vez en Europa en países como Alemania ó Italia, y se trataba de un virus H1_{pdm}N1_{pdm} que adquirió el gen N2 del linaje europeo H1_{av}N2 (83,84). También en el país germano y en Hungría, otros virus recombinantes

fueron identificados como virus H1_{pdm}N1, los cuales habían adquirido un gen N1 del linaje europeo H1_{av}N1 (85,86). En España, el subtipo H1_{pdm}N1_{pdm} fue detectado por primera vez entre el 2010-2011, en un estudio realizado por Martín Valls y col. en el noreste del país (61). Años más tarde, entre el 2017-2019, Sosa y col. confirmaron la circulación del subtipo H1_{pdm}N1_{pdm} entre la población porcina española, pero no detectaron ningún linaje híbrido de este virus. El último estudio de vigilancia de gripe porcina llevado a cabo en explotaciones europeas demuestra una mayor expansión del linaje H1_{pdm}N2, representando un 3,3% a nivel de granja; en este estudio el virus H1_{pdm}N2 de genoma reordenado se detectó en Alemania, Dinamarca, España y Países Bajos (72) . A conocimiento del autor, este trabajo es, por lo tanto, la primera descripción de un virus híbrido de linaje H1_{pdm}N1 en la cabaña porcina española.

En cuanto a los casos de co-infección, el 19% (23/124) de las muestras fueron positivas a más de un subtipo del virus de la Influenza A. La existencia de estas infecciones mixtas supone una oportunidad para que se produzca un reordenamiento genético entre los diferentes subtipos virales y esto ha llevado a la aparición y al mantenimiento de virus filogenéticamente diversos en la población porcina europea (87). En el estudio dirigido por Henritzi y col., llevado a cabo entre los años 2015-2018, se encontró que la mayoría de granjas europeas presentaban co-infección, mayoritaria por los linajes H1_{av}/H1_{hu}/N1_{av}/N2. En nuestro estudio, la co-infección por los linajes H1_{av} y H1_{hu} también fue la más frecuente, identificándose en un total de 16 muestras (70%). En el caso del tipo NA, la combinación N1 y N2 fue observada en el 30% de las muestras. En la Tabla 10 se puede apreciar el resto de combinaciones de los subtipos HA y NA que se identificaron en nuestro estudio.

Tabla 10. Identificación de co-infección de más de un tipo de HA o NA en las muestras evaluadas.

Coinfección de tipos de HA y de NA	Número de muestras (n=23)
H1_{av}/H1_{hu}	16
H1_{av}/H3	4
H1_{pdm}/H3	2
N1/N2	7
N1_{pdm}/N2	1

La mayoría de las muestras clasificadas como co-infección eran fluidos orales o *pooles* de hisopos nasales o de pulmones, y aunque no permiten asegurar la presencia de varios subtipos de Influenza en un mismo animal, indican la presencia de co-infección en esa granja. Por otro lado, la presencia de la infección por más de un subtipo viral, fue debidamente confirmada en

un total de 5 muestras (nº de muestras: 35, 37, 45, 73 y 127) procedentes de tejido pulmonar de un único animal.

La implementación de mejores métodos de diagnóstico, más sensibles y específicos, como es la caracterización molecular de subtipo de Influenza A por RT-qPCR (60) ha evidenciado una mayor frecuencia de co-infección y reordenamiento genético entre los tres subtipos porcinos europeos circulantes y el subtipo H1_{pdm}N1_{pdm}.

5.3. Estudio de los subtipos de Influenza A por secuenciación

5.3.1. Amplificación y secuenciación Sanger de los genes HA y NA

Con la finalidad de obtener una aproximación de la diversidad genética de los virus de la Influenza A circulantes en la cabaña porcina española, se decidió seleccionar un total de 68 muestras representativas de las diferentes regiones del país para secuenciar los genes HA y NA. En dicha selección se incluyeron muestras con un valor Cq <32 en el ensayo general de Influenza A, que no mostraran co-infección de subtipos virales y que procedían en la medida de lo posible de granjas diferentes, ya que generalmente dos muestras procedentes de la misma granja presentan un mismo subtipo viral.

Las muestras de los 68 casos clínicos seleccionados fueron amplificadas mediante PCR convencional y posteriormente visualizadas en geles de agarosa. Para realizar la secuenciación de las muestras amplificadas se consideró que sólo debía aparecer una única banda del tamaño adecuado; 1kb para los fragmentos del gen HA y 0,8kb para los fragmentos del gen NA. Sin embargo, en varias muestras se observó una o varias bandas adicionales de menor intensidad. Con el fin de secuenciar estas muestras se probaron varias temperaturas de annealing hasta conseguir eliminar en la medida de lo posible las amplificaciones inespecíficas y obtener la banda de interés con una intensidad adecuada (Figura 6).

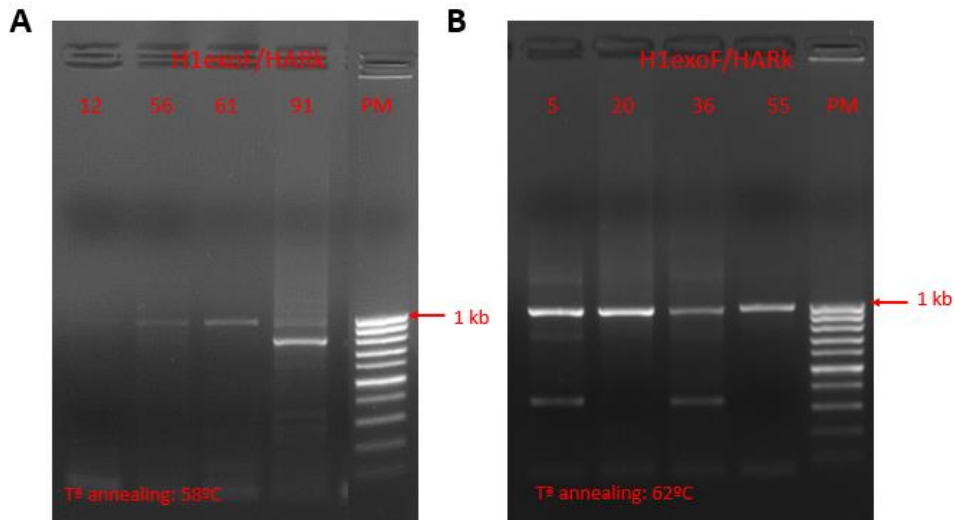


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de productos amplificados por PCR convencional para el gen HA del virus de la Influenza A. Los fragmentos que aparecen en los geles A y B fueron amplificados con los cebadores H1exoF/HARk. Sin embargo, las temperaturas de annealing utilizadas fueron diferentes A) 58°C, B) 62°C. Tras aumentar la temperatura se observa una mayor resolución de la banda de interés.

Tras la amplificación de los genes HA y NA por PCR convencional, solo fue posible secuenciar estos genes en 36 de las 68 muestras seleccionadas. Para el gen HA se obtuvo un total de 29 secuencias diferentes, la mayoría parciales y dos de ellas completas. En el caso del gen NA, se logró obtener 36 secuencias diferentes, de las cuales 20 eran completas. Por último, en sólo dos muestras (65 y 76) se logró secuenciar el gen HA y el gen NA por completo (Figura 7 y Anexo IV). La alta variabilidad que se observa en estos dos genes (HA y NA) dificulta la secuenciación de los mismos. Por lo general, para mejorar el éxito de la secuenciación, la mayoría de estudios describe un aislamiento previo del virus de Influenza A, en huevos de gallina embrionados libres de patógenos ó en células MDCK (*Madin-Darby CanineKidney*) con el objetivo de lograr secuencias “más limpias” (24,56,61).

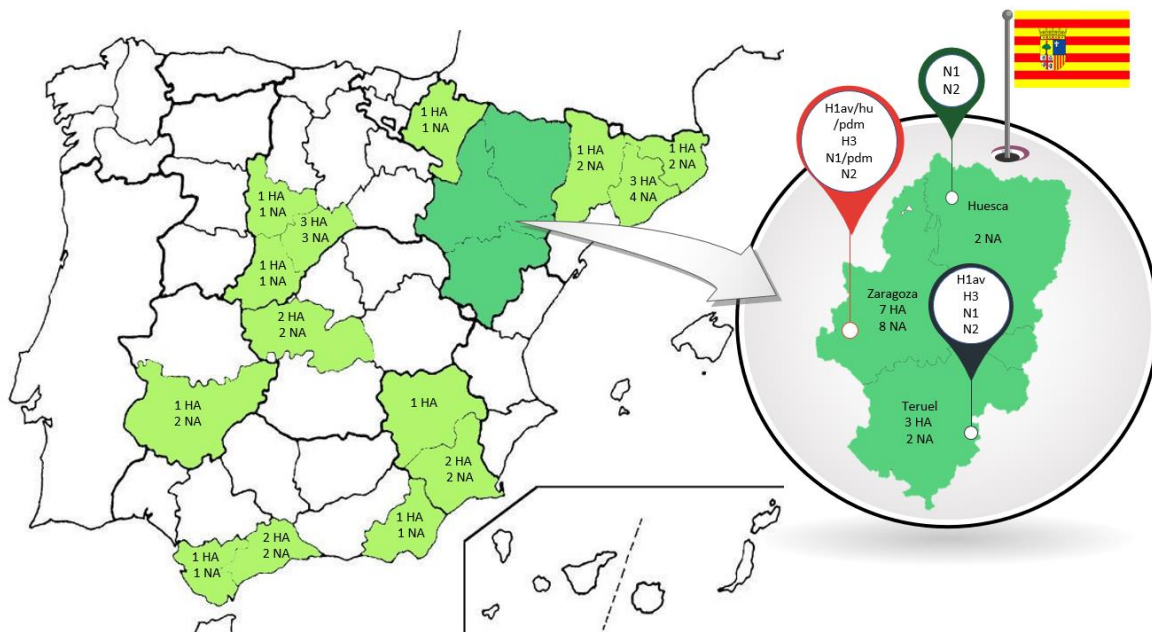


Figura 7. Distribución geográfica de las secuencias obtenidas para el gen HA y/o NA de SIV en España. Las muestras proceden de un total de 17 provincias resaltadas en color verde; en ellas se detalla el número de secuencias del gen HA y NA obtenidas. En el caso de la comunidad autónoma de Aragón, se muestran también los linajes de los genes secuenciados.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas consenso, se procedió a determinar los subtipos HA y NA utilizando la herramienta bioinformática BLASTn. El uso del BLASTn permite diferenciar entre los tipos H1 y H3, así como los tipos N1 y N2; pero no diferencia los distintos linajes de tipo H1. Para ello, se utilizó la base de datos *Influenza Research Database* (IRD), la cual asigna una nomenclatura de clado a cada una de las secuencias pertenecientes a ese tipo H1. Todos los clados en los que se agrupan las secuencias H1 del virus de la Influenza porcina A se corresponden a su vez con un nombre coloquial referido a los linajes que comúnmente circulan entre la población porcina, los cuales se describen en la Tabla 11 (88,89).

En general, el estudio de secuenciación permitió confirmar los subtipos del virus de la Influenza A identificados previamente en las muestras mediante la RT-qPCR, así como obtener una aproximación de la diversidad evolutiva existente entre las secuencias HA y NA obtenidas en nuestro estudio. Debido al bajo número de muestras seleccionadas para secuenciar en algunas provincias, no es posible inferir que el subtipo viral identificado sea representativo de las mismas en esa región.

Tabla 11. Clasificación en clados de los tres linajes principales del tipo H1 de SIV. Esta tabla recoge una lista de los nombres coloquiales disponibles para cada uno de los clados de tipo H1 del virus de la Influenza A, así como las regiones geográficas por las que circulan esos virus. Tabla modificada de Anderson et al. (88).

CLADO	NOMBRE COLOQUIAL	DISTRIBUCIÓN
LINAJE PORCINO CLÁSICO		
1A.1	α -H1	Canadá, China, Hong Kong, Italia, Japón, Méjico, Tailandia, Reino Unido, EEUU
1A.1.1		Canadá, Hong Kong, Corea del Sur, Taiwán, EEUU
1A.1.2		EEUU
1A.1.3		Tailandia
1A.2	β -H1	China, Hong Kong
1A.3		Méjico, Corea del Sur, EEUU
1A.3.1		USA
1A.3.2	γ -2-H1	Méjico
1A.3.3		Méjico, EEUU
1A.3.3.1		China, Hong Kong, EEUU
1A.3.3.2	H1N1pdm09	China
1A.3.3.3	γ -H1	37 países Corea del Sur, EEUU
LINAJE HUMANO ESTACIONAL		
1B.1	<i>Reassortante</i> europeo “tipo humano” H1huN2 (Derivado de A/swine/Scotland/41044/94)	Irlanda, Reino Unido
1B.1.1		Francia, Reino Unido
1B.1.2		España, Reino Unido
1B.1.2.1		Bélgica, Alemania, Italia, Países Bajos, España
1B.1.2.2	A/swine/Italy/4675/2003	Italia
1B.1.2.3		Francia
1B.2		Argentina, Chile, China, Hong Kong, Japón, Méjico, EEUU, Vietnam
1B.2.1	δ -2	EEUU
1B.2.2	δ -1	Argentina, Brasil, Canadá, Reino Unido, EEUU
1B.2.2.1	δ -1a	EEUU
1B.2.2.2	δ -1b	EEUU
LINAJE AVIAR EUROASIÁTICO		
1C.1	H1avN1 porcino “tipo aviar” (Derivado de A/swine/Arnsberg/6554/1979 y A/swine/Belgium/WVL1/1979)	Bélgica, Canadá, Francia, Alemania, Hong Kong, Irlanda, Italia, Países Bajos, España, Reino Unido
1C.2	H1avN1 porcino “tipo aviar” (Derivado de A/swine/Ille et Vilaine/1455/1999)	Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Alemania, Italia, Méjico, Países Bajos, Polonia, Suecia
1C.2.1		Bélgica, Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Países Bajos, Polonia, Rusia, España
1C.2.2		Francia, Alemania, Italia, Luxemburgo, Países Bajos, Polonia, España
1C.2.3		China, República Checa, Francia, Hong Kong, Italia, Polonia, Corea del Sur

5.3.2. Análisis de similitud nucleotídica entre las muestras secuenciadas.

El grado de similitud nucleotídica existente entre las secuencias de cada uno de los tipos identificados (H1, H3, N1 y N2) se evaluó mediante matrices de identidad realizadas con ayuda del programa SDT v1.2.

Los porcentajes de similitud entre las secuencias nucleotídicas de los virus de tipo H1 aparecen representadas en la Figura 8; el análisis demuestra que la similitud de estas secuencias

varía aproximadamente entre un 73% y un 100%. Al comparar las secuencias de los diferentes linajes de H1 entre sí (aviar, humano y pandémico), se observan porcentajes de similitud relativamente bajos (73-79%); lo cual indicaría que cada uno de estos linajes (H1_{av}, H1_{hu} y H1_{pdm}) ha evolucionado de manera independiente y se agruparían en clados diferenciados dentro de un mismo árbol filogenético. Por otro lado, cuando se analizan las secuencias H1 agrupadas en su respectivo linaje, se observa que los virus H1_{av} son los más diversos dentro de este tipo, con un grado de similitud entre ellos superior al 87% (Tabla 11); en el caso de los virus H1_{hu} y H1_{pdm}, estos son más conservados y presentan una similitud superior al 93% entre las secuencias de cada linaje (Tabla 12).

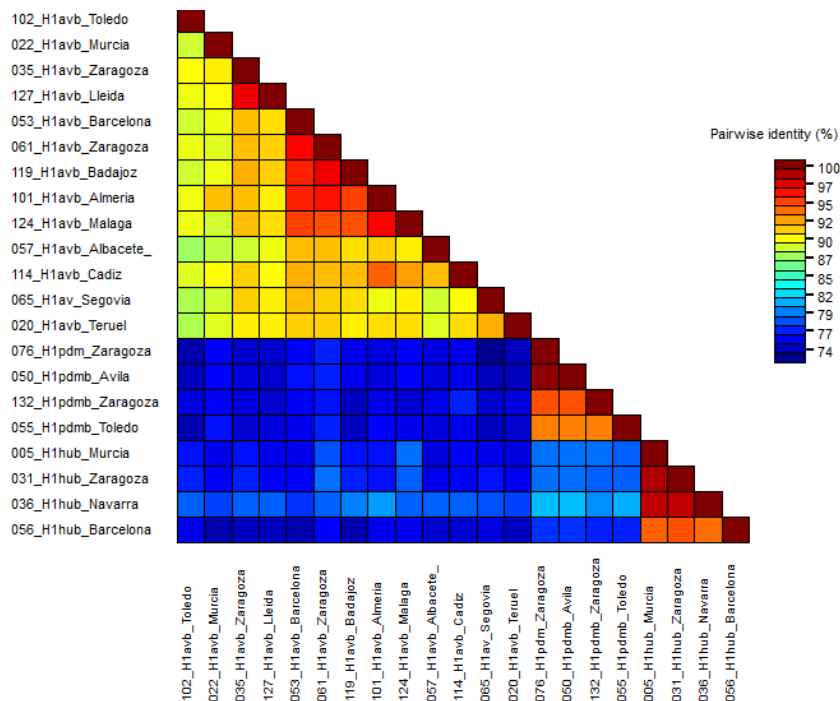


Figura 8. Matriz de identidad de secuencias nucleotídicas (en%) del tipo H1 de SIV. La matriz fue generada con el programa SDTv1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de tipo H1 del gen HA. Cada celda coloreada representa el porcentaje de identidad entre las secuencias de las dos muestras indicadas en los laterales.

Es destacable remarcar, que dos secuencias (casos n°102 y n°22) de tipo H1_{av} presentan la menor similitud (en torno al 85%) con el resto de secuencias del mismo linaje (Tabla 12). Estas muestras proceden de provincias distintas, Toledo y Murcia, respectivamente; las cuales se encuentran alejadas entre sí en el territorio español. Sin embargo, a nivel nucleotídico sólo la secuencia 102 es la más alejada evolutivamente de las otras secuencias españolas, pues aparece como un *outgroup* dentro del clúster de secuencias H1 aviar, tal como se precia más adelante en la Figura 12.

Tabla 12. Matriz de identidad nucleotídica para las secuencias (en%) de los virus del linaje H1 aviar de SIV. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso H1aviar del gen HA.

		H1 av												
		102	022	035	127	053	061	119	101	124	057	114	065	020
H1 av	102	100,0												
	022	88,5	100,0											
	035	89,9	90,2	100,0										
	127	89,6	89,6	96,9	100,0									
	053	88,5	89,4	91,6	90,8	100,0								
	061	89,4	89,0	91,6	91,2	96,5	100,0							
	119	88,6	89,6	91,8	91,0	95,7	96,9	100,0						
	101	89,6	91,4	91,4	90,3	95,6	96,4	95,0	100,0					
	124	89,6	88,4	91,4	90,9	94,8	94,6	94,6	96,8	100,0				
	057	87,4	88,2	88,7	89,2	91,5	91,5	90,5	91,0	90,1	100,0			
	114	89,2	90,0	91,1	90,0	92,2	91,4	91,7	94,2	92,5	91,4	100,0		
	065	87,7	88,5	91,1	90,1	91,6	91,2	90,5	89,4	90,1	88,4	89,8	100,0	
	020	87,5	89,2	90,1	90,2	91,2	91,1	90,1	90,6	90,7	89,1	90,6	92,0	100,0

Por último, cabe destacar que los virus de linaje pandémico presentes en las muestras nº50 y nº76 tienen una identidad de secuencia del gen HA del 99,7%. Estas muestras, aunque, proceden de provincias distintas (Ávila y Zaragoza, respectivamente) estarían infectadas por una cepa viral con un gen HA casi idéntico y posiblemente emparentadas.

Tabla 13. Matriz de identidad nucleotídica para las secuencias (en%) de los virus del linaje H1 humano y H1 pandémico de SIV. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de linajes H1 humano y H1 pandémico del gen HA.

		H1 pdm				H1 hu			
		076	050	132	055	005	031	036	056
H1 pdm	076	100,0							
	050	99,7	100,0						
	132	94,6	94,5	100,0					
	055	93,3	93,2	93,2	100,0				
H1 hu	005					100,0			
	031					98,9	100,0		
	036					98,2	98,3	100,0	
	056					94,2	94,6	93,7	100,0

En lo que respecta a las secuencias de tipo H3, estas tienen un alto grado de similitud entre ellas, el cual varía del 97% al 100% (Figura 9 y Tabla A 5.1. del Anexo V). Si se comparan los porcentajes de similitud obtenidos entre las secuencias H1 mostrados en la figura anterior con los obtenidos para las secuencias H3, estos últimos son mucho más altos, reflejando una menor diversidad evolutiva de los virus de tipo H3 respecto a los virus de tipo H1. De todas las secuencias H3 obtenidas, caben destacar tres parejas (19 y 87, 9 y 113 y 116 y 123) por tener

sus genes HA una similitud cercana o igual al 100%. Tanto las muestras nº19 y nº87 procedentes de Teruel, como las muestras nº9 y nº113 obtenidas de Málaga, procedían de la misma granja, aunque fueron recibidas en el laboratorio con meses de diferencia; estos resultados parecen indicar que la cepa de SIV que afecto a estas granjas en dos periodos de tiempo diferente estaban emparentadas o al menos mantuvieron el mismo gen HA. Las muestras nº116 y nº123 procedentes de Segovia, aunque no eran de la misma granja, fueron recibidas por el laboratorio con tan sólo un mes de diferencia. El alto grado de similitud obtenido en estos casos indica que posiblemente sea la misma cepa viral.

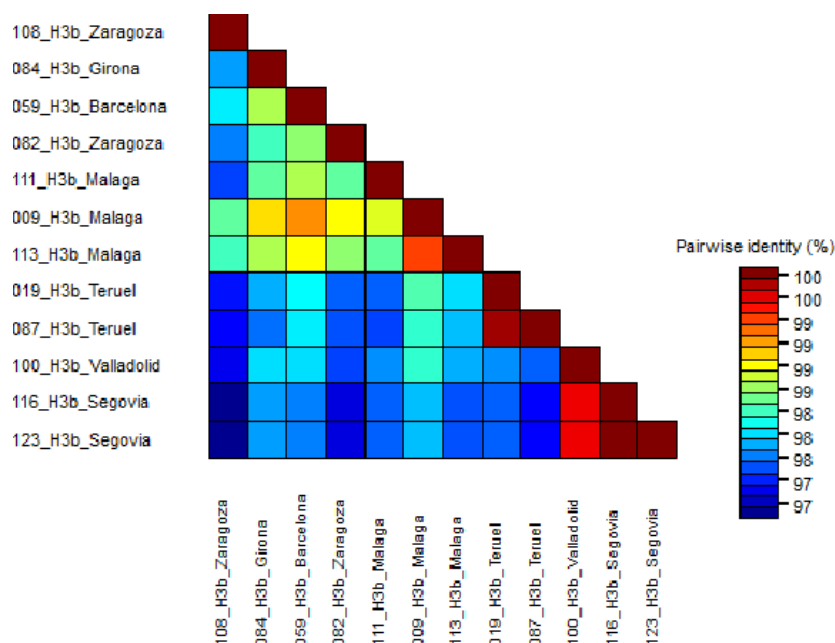


Figura 9. Matriz de identidad de secuencias nucleotídicas (en%) del tipo H3 de SIV. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de tipo H3 del gen HA. Cada celda coloreada representa el porcentaje de identidad entre las secuencias de las dos muestras indicadas en los laterales.

Por otro lado, el grado de similitud nucleotídica entre las secuencias del gen NA fue relativamente más alto para el tipo N1 (Figura 11 y Tabla A7.1. del *Anexo VII*) que para el tipo N2 (Figura 10 y Tabla A6.1. del *Anexo VI*). En el caso del tipo N2, la identidad de las secuencias varió desde un 79% hasta un 99%. En la Figura 10 se observan dos zonas de la matriz en la que las secuencias tienen alto grado de identidad entre ellas (90-99%) y, por otro lado, se observa una sección en la que el grado de similitud entre las secuencias es relativamente más bajo (79-84%). Algunas secuencias procedentes de provincias cercanas han mostrado porcentajes de identidad superior al 96%, como, por ejemplo, las secuencias 59, 48, 82 y 84 procedentes de

Barcelona, Zaragoza y Gerona, por un lado, y las secuencias de número 31, 36 y 46 procedentes de Zaragoza, Navarra y Huesca, por otro.

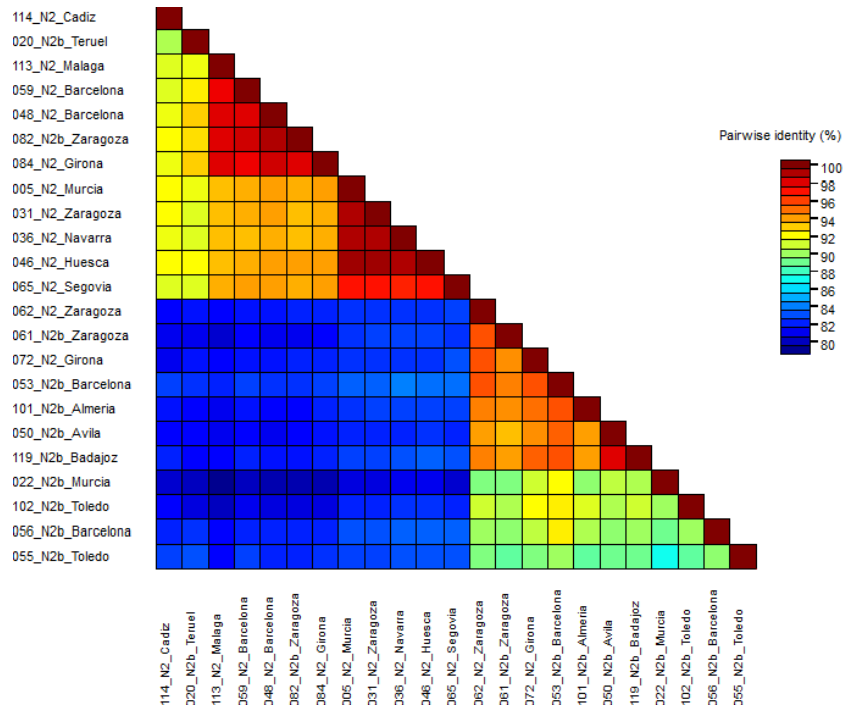


Figura 10. Matriz de identidad de secuencias nucleotídicas (en%) del tipo N2 de SIV. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de tipo N2 del gen NA. Cada celda coloreada representa el porcentaje de identidad entre las secuencias de las dos muestras indicadas en los laterales.

En la Figura 11 y en la Tabla A7.1. del *Anexo VII*, se observa que las secuencias pertenecientes al tipo N1 tienen un mayor grado de similitud entre ellas (86-100%). A pesar de que la secuencia 132 fue identificada como un linaje pandémico del tipo N1, esta también muestra una similitud entre un 86% y un 88% con el resto de secuencias de este linaje.

Resultan significativos los porcentajes de similitud entre las secuencias 78, 87, 91, 35 y 127, al ser más elevados que el resto (> 94%). Estas muestras proceden de las provincias de Aragón y de la provincia de Lleida, que son las zonas con mayor tasa de producción porcina intensiva. Al encontrarse estas provincias muy cercanas unas de otras, es común que cerdos de edades variadas sean trasladados entre granjas situadas en estas provincias para completar las diferentes fases de su ciclo productivo, siendo factible que cepas emparentadas se encuentren circulando en zonas colindantes.

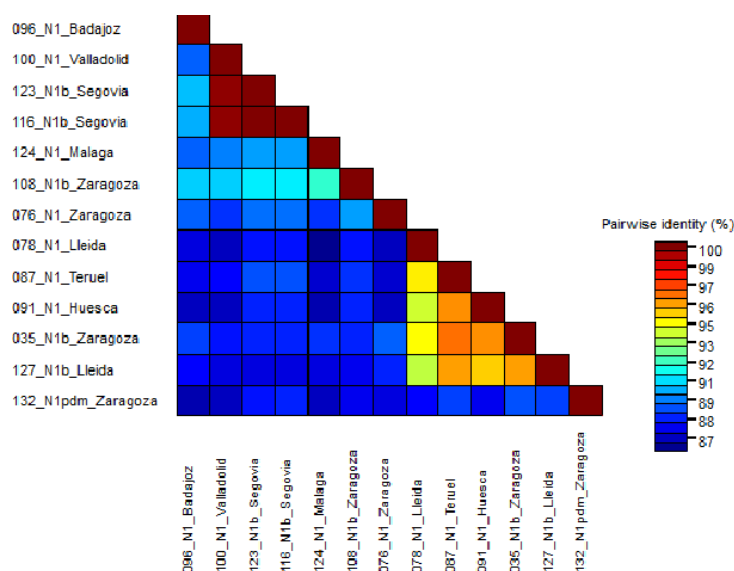


Figura 11. Matriz de identidad de secuencias nucleotídicas (en%) del tipo N1 de SIV. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de tipo N1 del gen NA. Cada celda coloreada representa el porcentaje de identidad entre las secuencias de las dos muestras indicadas en los laterales.

5.3.3. Análisis filogenético.

Con el objetivo de analizar la diversidad evolutiva de los diferentes SIV circulantes en nuestro país, se procedió a realizar estudios comparativos entre las 36 secuencias consenso de los genes HA (n=29) y NA (n=36) obtenidas aquí y las secuencias de referencia para cada tipo de HA o NA descritas previamente en España o en otros países europeos.

En la Figura 12, se observa el árbol filogenético de los virus de la Influenza A de tipo H1 identificados en nuestro estudio. En primer lugar, se observan tres clados independientes, correspondientes a los tres linajes de H1: aviar, humano y pandémico. A pesar de que los tres linajes H1 ($H1_{av}$, $H1_{hu}$ y $H1_{pdm}$) han tenido un ancestro común, no se cruzan a nivel genético o lo hacen de forma limitada. Probablemente, esto se deba a que los tres linajes de H1 han evolucionado por deriva antigénica de forma aislada en tres especies distintas antes de introducirse en el cerdo en Europa; en aves el $H1_{av}$, en humanos el $H1_{hu}$, y en cerdos en Norteamérica el $H1_{pdm}$ (90).

Dentro del grupo monofilético H1 aviar, la secuencia 102 muestra mayor similitud por cepas europeas que por el resto de secuencias de este linaje obtenidas en el estudio. Así pues, esa secuencia se agrupa en un mismo clúster con dos secuencias de origen alemán y danés, aunque también con una secuencia española obtenida por Sosa Portugal. Esta mayor similitud por secuencias extranjeras se podría explicar como un proceso de evolución local de un virus procedente de estas regiones del norte de Europa introducido en la granja a través de la llegada

de animales de reposición. Algo similar le ocurre a la secuencia 22, la cual presentó una similitud del 95% con una secuencia reciente aislada en Francia en el año 2020.

En general, la mayoría de secuencias de linaje H1 aviar obtenidas en este estudio forman clústeres con las secuencias de referencia procedentes de España y en menor grado con otras secuencias europeas. Además, son más similares a las secuencias españolas recientes (2017-2019) que a secuencias más antiguas aisladas a principio de siglo, demostrando así que los virus de la Influenza A en nuestro país, al igual que en el resto del mundo, siguen en una constante evolución.

Por otro lado, las secuencias 50 y 76 de linaje H1 pandémico, procedentes de Ávila y Zaragoza, se agrupan en una misma rama dentro del árbol, debido al elevado grado de similitud (99,7%) que presentan. La secuencia 55, sin embargo, se encuentra relativamente alejada del resto de secuencias pandémicas españolas, y presentaba una mayor similitud (99%) con una secuencia aislada en Bélgica en el año 2019. Asimismo, cabe mencionar que las secuencias de linaje H1 pandémico obtenidas en este estudio no forman clúster con la secuencia aislada en Méjico, ciudad donde se declaró la gripe porcina de 2009.

Por último, las secuencias de linaje humano obtenidas muestran cierta diversidad evolutiva entre sí, en especial la secuencia 56 procedente de Barcelona. Esta secuencia no muestra altos valores de similitud con ninguna de las secuencias de referencia seleccionadas.

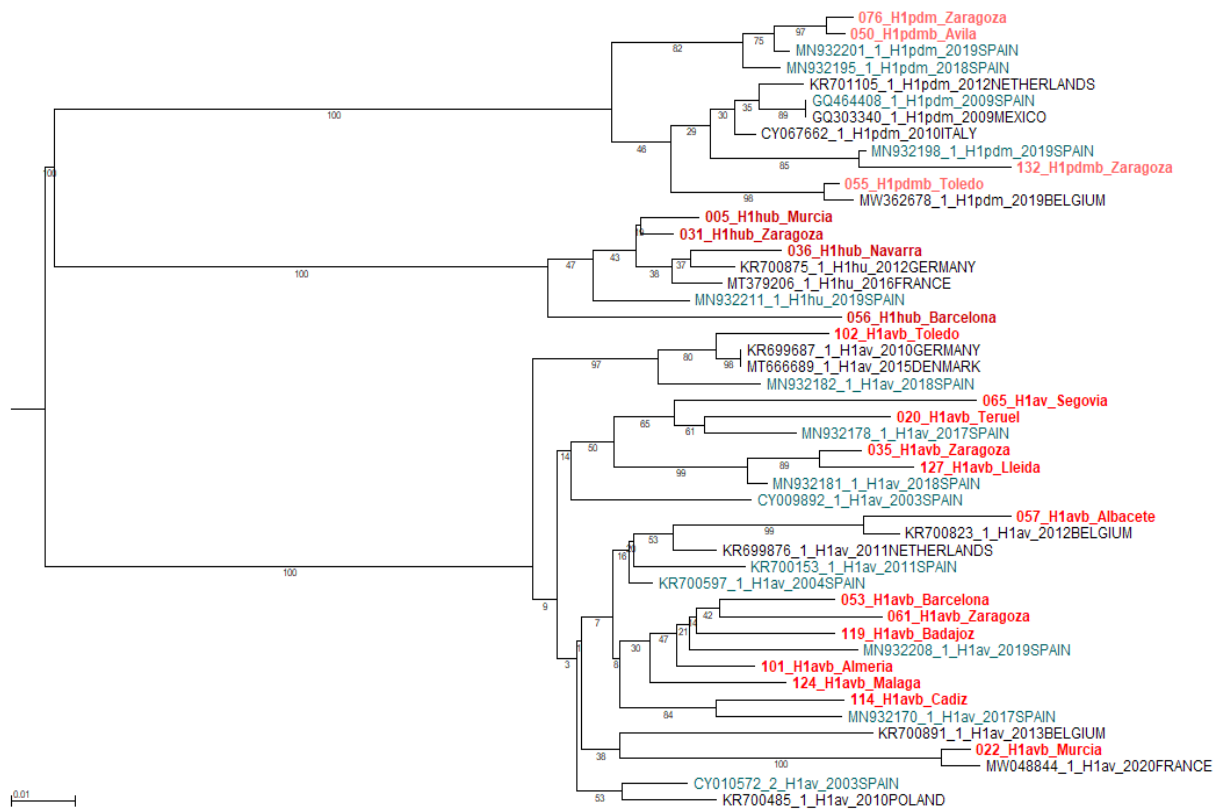


Figura 12. Análisis filogenético del gen HA (secuencias parciales) para los SIV de tipo H1. El filograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un *bootstrap* $n=1000$ cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en rojo son las evaluadas en este estudio mientras que el resto de secuencias son las de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (*Tabla A3.1. del Anexo III*).

En cuanto al tipo H3 del virus de la Influenza A, su árbol filogenético aparece representado en la Figura 13. En este árbol aparecen dos clados diferenciados: un primer clado agrupa a todas las secuencias de referencia H3 clásicas (KR701344_H3_1984BELGIUM) y el otro agrupa a todas las secuencias de tipo H3 obtenidas en este estudio junto con una cepa española perteneciente a un nuevo tipo H3 humano estacional (MN929035_H3_2017SPAIN) descrita por Sosa Portugal (24). Las cepas H3 clásicas europeas derivan del subtipo H3N2 que dio lugar a la gripe de Hong Kong en 1968, pero no fue hasta 1984 cuando en Europa se asoció directamente con brotes respiratorios en cerdos. La co-circulación de este subtipo junto con otros subtipos de diferente origen hizo que estas cepas clásicas sufrieran múltiples intercambios genéticos dando lugar a las nuevas cepas estacionales H3N2 (31).

A diferencia del estudio realizado por Sosa (24), en este trabajo no se han encontrado secuencias H3 clásicas, sino que todas las secuencias son similares a la nueva cepa H3 estacional humana. Resulta interesante comentar que las secuencias H3 clásicas obtenidas por Sosa fueron aisladas en 2017, y a pesar de ser relativamente recientes mostraban similitud con cepas de referencia más antiguas. Sin embargo, todas sus secuencias H3 estacionales se aislaron

uno o dos años más tarde, en 2018 y 2019 respectivamente, indicando la tendencia de los virus H3N2 a evolucionar hacia nuevo tipo estacional humano.

Las secuencias 19 y 87 procedentes ambas de Teruel y de la misma granja presentaban un 99,9% de similitud. Como se puede observar en el árbol (Figura 13) estas secuencias se agrupan en una misma rama con un alto valor de *bootstrap* (99%), y probablemente representen a una misma cepa viral. Algo similar ocurre con las muestras 116 y 123 procedentes de Segovia, aunque de diferente granja. Sus secuencias de tipo H3 se encuentran agrupadas juntas, ya que presentaban un porcentaje de similitud del 100% en la matriz de identidad de secuencias elaborada con el programa SDT v 1.2 (Figura 9 y Tabla A5.1. del Anexo V). Esto nos llevaría a considerar que ambas secuencias pertenecen a la misma cepa viral.

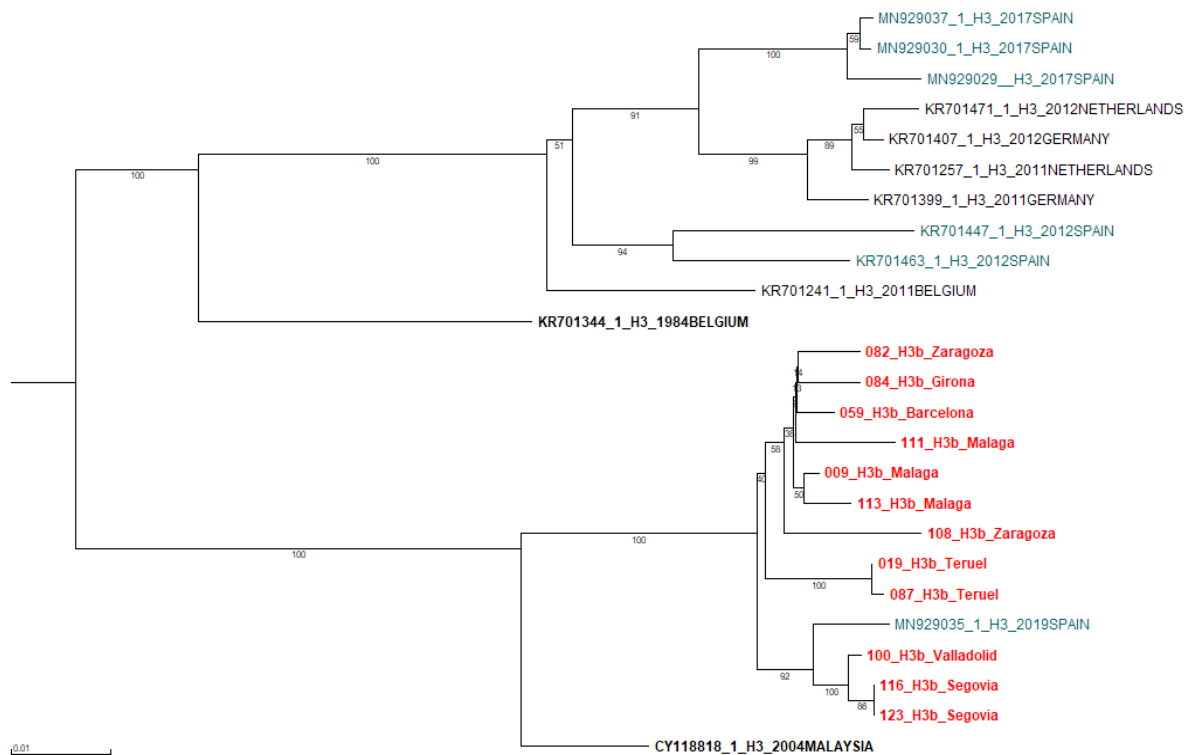


Figura 13. Análisis filogenético del gen HA (secuencias parciales) para los SIV de tipo H3. El filograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un *bootstrap* n=1000 cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en rojo son las evaluadas en este estudio mientras que el resto de secuencias son las de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla A3.1. del Anexo III).

En la Figura 14 se observa el filograma que muestra las relaciones evolutivas entre las secuencias obtenidas de tipo N2. En este caso, al igual que ocurría en los otros árboles también aparecen dos clados diferenciados con valores de *bootstrap* del 99%. En general, las secuencias N2 obtenidas mediante secuenciación de Sanger forman diferentes clústeres entre ellas, agrupándose a su vez con secuencias españolas descritas entre 2017 y 2019 por Sosa. Esto demuestra la mayor similitud de nuestras secuencias con cepas españolas que con cepas de otros

países europeos, pero es llamativa la secuencia 102 situada en un mismo clúster con una cepa holandesa. A pesar de la formación de dos cladogramas, todas las secuencias se agrupan con secuencias de referencia aisladas recientemente, y sólo con una cepa más antigua descrita en 2002.

Por otro lado, algunas de las secuencias incluidas en este árbol (JF960171_1_N2_2010SPAIN, JX908139_1_N2_2010SPAIN y KR700594_1_N2_2012SPAIN) fueron descritas por Simon-Grifé en un trabajo publicado en 2012 (56), y como se observa en el siguiente árbol esas secuencias no son tan similares a nuestras secuencias, sino que más bien se encuentran alejadas evolutivamente, demostrando la rápida evolución de los virus de la Influenza A.

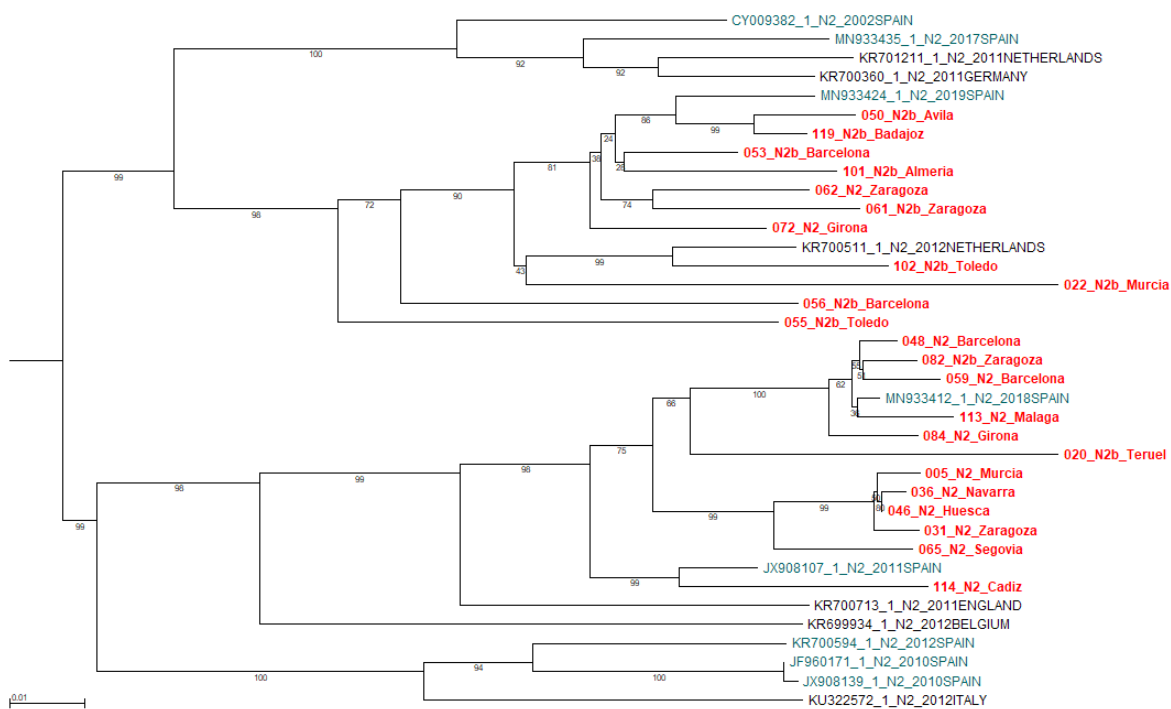


Figura 14. Análisis filogenético del gen NA (secuencias parciales) para los SIV de tipo N2. El filograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un *bootstrap* n=1000 cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en rojo son las evaluadas en este estudio mientras que el resto de secuencias son las de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (*Tabla A3.1. del Anexo III*).

Por último, las relaciones filogenéticas de las secuencias de tipo N1 aparecen representadas en el filograma de la Figura 15. Como ya hemos comentado anteriormente en este apartado, las secuencias 116 y 123 de Segovia pertenecerían a la misma cepa viral y por este motivo, se agrupan juntas en un mismo *subtree* con un valor de *bootstrap* del 99%.

La mayoría de secuencias tipo N1 actuales europeas derivan de la cepa clásica H1_{av}N1 introducida en Europa en 1979. Si se observa la Figura 15, la secuencia CY084883_2_N1_1979HONGKONG, representativa del gen N1 de la cepa clásica, aparece como

un *outgroup*, demostrando que todos los virus tipo N1 actuales se encuentran alejados evolutivamente de esa primera variante.

También resulta interesante las secuencias 35, 78, 87, 91 y 127, las cuales al constituir la parte más conservada de la matriz de identidad de tipo N1 (Figura 11), y proceder de provincias colindantes, se agrupan en un clúster local. La formación de estas agrupaciones locales, también ha sido observada por Sosa en el análisis filogenético del gen M, llegando esta investigadora a sugerir que el desarrollo de esas variantes locales suponía una ventaja evolutiva para el virus.

La única secuencia de linaje N1 pandémico se agrupa en un mismo clúster con una secuencia descrita por Sosa en 2019, y diverge evolutivamente de las otras secuencias de tipo N1 descritas en este estudio.

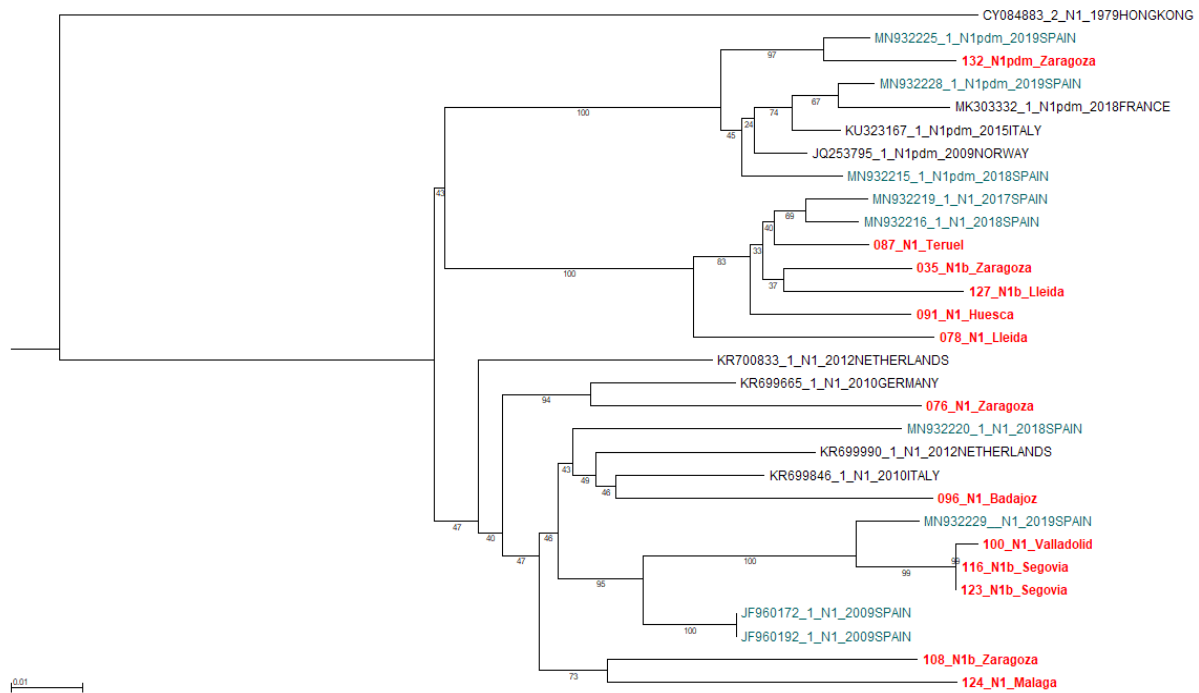


Figura 15. Análisis filogenético del gen NA (secuencias parciales) para los SIV de tipo N1. El filograma se elaboró mediante el método Neighbor-joining y usando un *bootstrap* n=1000 cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en rojo son las evaluadas en este estudio mientras que el resto de secuencias son las de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (*Tabla A3.1. del Anexo III*).

5.5. Discusión general

Los numerosos estudios publicados en España y en el resto de Europa, así como el desarrollo de programas de vigilancia, como los proyectos ESNIP, reflejan la importancia de la Influenza A en el ganado porcino (19,24,42,61,72,87,89). El presente trabajo ha permitido obtener una aproximación de la situación epidemiológica del virus de la Influenza A en las granjas porcinas

españolas. Para ello, se ha realizado una identificación molecular del subtipo de los virus de la Influenza A por RT-qPCR y por secuenciación, en 132 muestras positivas a este agente. Las muestras procedían de 22 provincias españolas, aunque el mayor número de casos (63%) se concentraba en Aragón y Cataluña, al tratarse de las comunidades autónomas con mayor tasa de producción porcina intensiva y principal zona de influencia del laboratorio.

Por otro lado, en nuestro estudio existía una mayor proporción de muestras procedentes de animales en fase de transición que de animales lactantes o en fase de engorde. Este grupo de población fue también el más numeroso en otro estudio similar publicado por Sosa Portugal, demostrando que el destete es un momento crítico para los lechones. Resulta imprescindible, por tanto, la monitorización y vigilancia de los cerdos en transición, ya que son los diseminadores silenciosos de la gripe si es que no disponen de una adecuada inmunidad pasiva proporcionada por la madre a través del calostro (91).

En este estudio, se ha logrado la identificación del subtipo de SIV por RT-qPCR en el 94% de las muestras, siendo este porcentaje relativamente superior al obtenido por Sosa Portugal (65%). En ambos estudios se utilizó el protocolo de RT-qPCR propuesto por Henritzi. Sin embargo, la modificación y diseño de nuevos cebadores nos ha permitido tener un mayor éxito en el subtipado de los virus de la Influenza.

El subtipo H1_{av}N2 fue el más frecuente entre nuestras muestras, identificándose en 46 de ellas. Sin embargo, en otros países europeos como Bélgica, Francia o Alemania, el subtipo H1_{av}N1 sigue siendo el más extendido entre la población porcina. Por el contrario, Dinamarca sí que mostro un mayor porcentaje de granjas positivas a H1_{av}N2 en un estudio publicado por Henritzi en 2020 (72). A la vista de los resultados, no se puede sacar ninguna conclusión sobre la tendencia epidemiológica de los virus de la Influenza A en Europa, pero lo que está claro es que la situación de cada país es diferente y determinante en la distribución de subtipos virales entre la población porcina. Además, países como Alemania, España o Dinamarca muestran una mayor variabilidad de subtipos al tener tasas de producción porcino muy superiores a otros países europeos.

Es destacable comentar que la situación epidemiológica no ha sido siempre la misma en España. Hasta hace algunos años, estudios llevados a cabo en granjas españolas, mostraban que el subtipo más frecuente era el H1_{av}N1 (19). Sin embargo, la situación pareció cambiar con la aparición del nuevo subtipo pandémico. Desde entonces, y poco a poco el subtipo H1_{av}N1 ha dejado de ser el más frecuente, dando paso al subtipo H1_{av}N2. Además, a partir del subtipo

pandémico han surgido por intercambio genético nuevos subtipos virales. Entre ellos, el subtipo H1_{av}N1_{pdm}, que, a conocimiento del autor, se habría descrito por primera vez en este estudio en la población porcina española.

El subtipado por secuenciación resultó más complicado que por RT-qPCR. De hecho, tan sólo fue posible secuenciar alguno de los fragmentos de HA o de NA de 36 muestras. La alta variabilidad de estos dos genes dificultó su amplificación por PCR convencional. Aun así, en dos muestras (65 y 76) se logró secuenciar el gen HA y el gen NA por completo. En cuanto a la calidad de las secuencias, las del gen NA fueron mejores, así como más fáciles de lograr, en comparación con las secuencias de HA. Esto es debido a que el gen HA es más variable que el gen NA, y muestra una mayor diversidad de linajes.

En general, la secuenciación de las muestras, y la posterior realización de los árboles filogenéticos, nos permitió obtener una aproximación de la diversidad evolutiva de los virus de la Influenza de SIV circulantes en la actualidad en nuestro país, revelando una mayor similitud con cepas virales españolas descritas en los últimos dos años que con aquellas de hace una década o más.

Por último, la vigilancia continua de las poblaciones porcinas en Europa es esencial para seguir la evolución de los SIVs. Obtener información sobre los cambios dinámicos en los genotipos y la aparición de nuevos fenotipos con propensiones zoonóticas de los SIV es el núcleo de la política de OneHealth. Este enfoque pretende unificar la salud humana y veterinaria tanto en el diagnóstico como en la vacunación. De hecho, recientemente, se ha publicado un estudio en el que desarrollan un único ensayo RT-qPCR para la detección universal de todos los virus de la Influenza A sin diferencia de subtipos, origen y distribución global, con el fin de unificar el monitoreo de IAV en diferentes hospedadores y aplicar el enfoque de OneHealth (92). En cuanto al control de esta enfermedad, la mejor estrategia de protección sería el diseño de una vacuna que incorporara todos los subtipos circulantes y cepas lo más actuales posibles. De esta forma, cubriría todas las reordenaciones entre sí, ofreciendo una protección total frente al virus de la gripe porcina. Sin embargo, estas vacunas polivalentes son difíciles de conseguir, tanto técnica como económicamente, debido a que los linajes virales difieren en los distintos continentes y regiones.

6. CONCLUSIONES

1. La mayoría de muestras positivas a Influenza A en este estudio fueron de animales en la fase de transición (46%), aunque este agente también fue identificado en lechones lactantes (9%) y cerdos de engorde (25%).
2. El uso de ensayos de RT-qPCR permitió identificar molecularmente el subtipo del SIV circulante en el 94% (124/132) de las muestras incluidas en el estudio, detectándose co-infección viral en un 18% de estas muestras.
3. El subtipo H1_{av}N2 fue el más frecuente con un 43% (44/101) de las muestras identificadas, aunque también se detectaron los subtipos H1_{av}N1 (10%), H3N1 (11%), H3N2 (n10%) y H1_{pdm}N1_{pdm} (2%); todos los cuales han sido descritos en estudios previos en España.
4. Nuestro estudio es el primero que describe en España casos de infección por un virus *reassortant* H1_{pdm}N1 en la población porcina.
5. La comparación de similitudes nucleotídicas demuestra que los tipos H1 y N2 son los más diversos dentro de cada subtipo de SIV descrito en este estudio.
6. El análisis filogenético indica que las cepas secuenciadas aquí son más similares a las cepas españolas descritas en los años 2017-2019 que a las identificadas en años anteriores (2010-2012), demostrando la constante evolución de este agente.

-
1. Most of influenza A positive samples in this study were from animals in the transition phase (46%), although this agent was also identified in piglets (9%) and fattening pigs (25%).
 2. The use of RT-qPCR assays allowed the molecular identification of the subtype of SIV present in 94% (124/132) of the samples included in the study, detecting viral co-infection in 18% of the samples.
 3. In the present study, the H1_{av}N2 subtype was the most frequent with 43% (44/101) of the identified samples, although the H1_{av}N1 (10%), H3N1 (11%), H3N2 (n10%) and H1_{pdm}N1_{pdm} (2%) subtypes were also detected; all of them have been described in previous studies in Spain.
 4. Our study is the first one to describe infection cases by a reassortant H1_{pdm}N1 virus in the Spanish pig population.

5. The nucleotide similarity comparison shows that types H1 and N2 are the most diverse within each subtype of SIV described in this study.
6. The phylogenetic análisis indicates that the strains sequenced in this work are more similar to the Spanish strains described in the years 2017-2019 by Sosa Portugal than to those identified in 2010-2012, demonstrating the constante evolution of this agent.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Zou S. A practical approach to genetic screening for influenza virus variants. *J Clin Microbiol.* 1997;35(10):2623–7.
2. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.*1992; 56(1): 152–179.
3. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol.* 2000; 74: 29–46.
4. Webster RG, Sharp GB, Claas ECJ. Interspecies Transmission of Influenza Viruses. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152: S25–30.
5. Ma W, Kahn RE, Richt JA. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J Mol Genet Med.* 2009;3(1):158–66.
6. Zell R, Scholtissek C, Ludwig S. Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 370:29–55.
7. Ma W, Lager KM, Vincent AL, Janke BH, Gramer MR, Richt JA. The Role of Swine in the Generation of Novel Influenza Viruses. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56(6–7):326–37.
8. Ito T, Couceiro JNSS, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential. *J Virol.* 1998;72(9):7367–73.
9. Shao W, Li X, Goraya M, Wang S, Chen J-L. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1650.
10. Piret J, Boivin G. Pandemics Throughout History. *Front Microbiol.* 2021;11(631736):1–16.
11. Worobey M, Han G-Z, Rambaut A. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(22):8107–12.
12. Akin L, Gözel MG. Understanding dynamics of pandemics. *Turk J Med Sci.* 50:515–9.
13. McHardy AC, Adams B. The Role of Genomics in Tracking the Evolution of Influenza A Virus. Manchester M, editor. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000566.
14. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primer.* 2018;4(1):3.
15. Enserink, M. MEDICINE: Initiative Aims to Merge Animal and Human Health Science to Benefit Both. *Science.* 2007; 316:1553a.
16. El sector porcino español logra en 2020 un récord histórico en exportaciones que consolida el modelo europeo de producción segura, sostenible y de calidad [Internet]. *Let's Talk About Pork From Europe.* 2021 [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://letstalkaboutepork.com/wp-content/uploads/2021/03/NdP-Record-historico-exportacion-porcino-.pdf>

17. INFORME TRIMESTRAL INDICADORES DE PORCINO. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. [Internet]. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; 2021 Mar. Available from: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/dashboard1trim2021_tcm30-537503.pdf
18. INFORME SICE EVOLUCIÓN DEL COMERCIO EXTERIOR DEL SECTOR PORCINO ESPAÑOL EN EL AÑO 2020 [Internet]. INTERPORC SPAIN; 2021 Feb. Available from: <https://www.sinfoporc.com/evoluci%C3%B3n-de-las-exportaciones-esp%C3%B1olas/>
19. Simon-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, García-Bocanegra I, Mora M, Martín M, et al. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet Microbiol.* 2011;149(1–2):56–63.
20. Rose N, Hervé S, Eveno E, Barbier N, Eono F, Dorenlor V, et al. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Vet Res.* 2013; 44(72):1–14.
21. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* 2009; 143(2):147–61.
22. Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, et al. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci.* 2008; 105(46):17736–41.
23. Mostafa A, Abdelwhab E, Mettenleiter T, Pleschka S. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses.* 2018;10(9):497.
24. Sosa Portugal S, Cortey M, Tello M, Casanovas C, Mesonero-Escuredo S, Barrabés S, et al. Diversity of influenza A viruses retrieved from respiratory disease outbreaks and subclinically infected herds in Spain (2017–2019). *Transbound Emerg Dis.* 2020; 00:1–12.
25. Urbaniak K, Markowska-Daniel I. In vivo reassortment of influenza viruses. *Acta Biochim Pol.* 2014; 61(3).
26. Pleschka S. Overview of Influenza Viruses. Richt JA, Webby RJ, editors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012; 370:1–20.
27. Sandbulte M, Spickler A, Zaabel P, Roth J. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines.* 2015; 3(1):22–73.
28. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol.* 2019; 10:39.
29. Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Evolutionary Analysis of the Influenza A Virus M Gene with Comparison of the M1 and M2 Proteins. *J Virol.* 1991; 65:5491–8.
30. Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4096–101.
31. Brown IH. History and Epidemiology of Swine Influenza in Europe. Richt JA, Webby RJ, editors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011; 370:133–46.
32. Dadonaite B, Gilbertson B, Knight ML, Trifkovic S, Rockman S, Laederach A, et al. The structure of the influenza A virus genome. *Nat Microbiol.* 2019; 4(11):1781–9.

33. Eisefeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(1):28–41.
34. Arranz R, Coloma R, Chichon FJ, Conesa JJ, Carrascosa JL, Valpuesta JM, et al. The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins. *Science.* 2012; 338(6114):1634–7.
35. Barman S, Ali A, Hui EK-W, Adhikary L, Nayak DP. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res.* 2001; 77(1):61–9.
36. Kuntz-Simon G, Madec F. Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses Public Health.* 2009;16.
37. Casanovas C. Comparación entre la Influenza humana y la Influenza porcina. *Anaporc.* 2017; 14(143):14–20.
38. Campitelli L, Donatelli I, Foni E, Castrucci MR, Fabiani C, Kawaoka Y, et al. Continued Evolution of H1N1 and H3N2 Influenza Viruses in Pigs in Italy. *Virology.* 1997; 232(2):310–8.
39. Castrucci, M. R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., & Webster, R. G. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology.* 1993; 193(1): 503–506.
40. Alexander DJ, Brown IH, Harris PA, McCauley JW. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol.* 1998;79(12):2947–55.
41. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 2009; 459(7249):931–9.
42. Watson SJ, Langat P, Reid SM, Lam TT-Y, Cotten M, Kelly M, et al. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol.* 2015; 89(19):12.
43. Cox NJ, Brammer TL, Regnery HL. Influenza: Global surveillance for epidemic and pandemic variants. *Eur J Epidemiol.* 1994; 10(4):467–70.
44. Simon G, Larsen LE, Dürrwald R, Foni E, Harder T, Van Reeth K, et al. European Surveillance Network for Influenza in Pigs: Surveillance Programs, Diagnostic Tools and Swine Influenza Virus Subtypes Identified in 14 European Countries from 2010 to 2013. *PLoS ONE.* 2014; 9(12):e115815.
45. Rajao DS, Anderson TK, Gauger PC, Vincent AL. Pathogenesis and Vaccination of Influenza A Virus in Swine. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014; 385:307–26.
46. Deblanc C, Hervé S, Gorin S, Cador C, Andraud M, Quéguiner S, et al. Maternally-derived antibodies do not inhibit swine influenza virus replication in piglets but decrease excreted virus infectivity and impair post-infectious immune responses. *Vet Microbiol.* 2018; 216:142–52.
47. Loeffen WLA, Heinen PP, Bianchi ATJ, Hunneman WA, Verheijden JHM. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 92:23–35.
48. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, et al. An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. *J Comp Pathol.* 2010; 143:120–31.

49. Saade G, Deblanc C, Bougon J, Marois-Créhan C, Fablet C, Auray G, et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet Res.* 2020; 51(1):80.
50. Janke BH. Clinicopathological Features of Swine Influenza. Richt JA, Webby RJ, editors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 370:69–83.
51. Charley B, Riffault S, Van Reeth K. Porcine Innate and Adaptative Immune Responses to Influenza and Coronavirus Infections. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1081(1):130–6.
52. Crisci E, Mussá T, Fraile L, Montoya M. Review: Influenza virus in pigs. *Mol Immunol.* 2013; 55(3–4):200–11.
53. Detmer S, Gramer M, Goyal S, Torremorell M, Torrison J. Diagnostics and Surveillance for Swine Influenza. Richt JA, Webby RJ, editors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 370:85–112.
54. Wilson ML. General Principles of Specimen Collection and Transport. *Clin Infect Dis.* 1996; 22:766–77.
55. Taubenberger J. Diagnosis of influenza virus: Coming to grips with the molecular era. *Mol Diagn.* 2001; 6(4):291–305.
56. Simon-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, Busquets N, Mora-Salvatierra M, Bestebroer TM, et al. Swine influenza virus infection dynamics in two pig farms; results of a longitudinal assessment. *Vet Res.* 2012; 43(1):24.
57. Ma W, Richt JA. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives. *Anim Health Res Rev.* 2010;11(1):81–96.
58. Van Reeth K, Ma W. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change—That’s the Question. Richt JA, Webby RJ, editors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 370:173–200.
59. CIMA VET, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [Internet]. [cited 2021 Jun 15]. Available from: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html>
60. Henritzi D, Zhao N, Starick E, Simon G, Krog JS, Larsen LE, et al. Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT - PCR s. *Influenza Other Respir Viruses.* 2016;10(6):504–17.
61. Martín-Valls GE, Simon-Grifé M, van Boheemen S, de Graaf M, Bestebroer TM, Busquets N, et al. Phylogeny of Spanish swine influenza viruses isolated from respiratory disease outbreaks and evolution of swine influenza virus within an endemically infected farm. *Vet Microbiol.* 2014; 170:266–77.
62. Bragstad K, Jørgensen PH, Handberg KJ, Møllergaard S, Corbet S, Fomsgaard A. New avian influenza A virus subtype combination H5N7 identified in Danish mallard ducks. *Virus Res.* 2005;109(2):181–90.
63. Prickett JR, Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev.* 2010;11(2):207–16.
64. Nardelli L, Pascucci S, Gualandi GL, Loda P. Outbreaks of Classical Swine Influenza in Italy in 1976. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B.* 2010;25(10):853–7.
65. Plana Duran, J., Vayreda, M., Vila, X., Marrull, L. Isolation for the first time in Spain of the swine Influenza virus. In: Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society Congress, Gent, Belgium. 1984: 62.

66. Pensaert M, OrTIs K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. 1981;59(1):75–8.
67. Gourreau J. M., Kaiser C., Fontaine M., Madec F., Aymard M., Vigouroux A., Salingardes F. et Labie J. Evolution de la grippe porcine en France. In: La Grippe, Grippe Humaine, Grippes Animales, les Vaccins. Collection Fondation Marcel Mérieux. 1982: 65-67.
68. Ottis K., Bollwahn W., Bachmann P. A. und Heinritzi K. Ausbruch von Schweineinfluenza in der Bundesrepublik Deutschland: Klinik, Nachweis und Differenzierung. Tierdrztl. Umschau. 1981 (36): 608-512.
69. Haesebrouck F, Pensaert M. Influenza in swine in Belgium (1969–1986) Epizootiologic aspects. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1988;11(3–4):215–22.
70. Masurel N., De Boer G. F., Anker W. J. J. and Huffels A. D. N. H. J. Prevalence of influenza viruses A-H1N1 and A-H3N2 in swine in the Netherlands. *Comp. Immun. Microbiol infect. Dis.* 6, 141-149 (1983).
71. Brown IH, Harris PA, Alexander DJ. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991–2. *Epidemiol Infect.* 1995;114(3):511–20.
72. Henritzi D, Petric PP, Lewis NS, Graaf A, Pessia A, Starick E, et al. Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses. *Cell Host Microbe.* 2020;28(4):614-627.e6.
73. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013;4(1):19.
74. Ryt-Hansen P, Larsen I, Kristensen CS, Krog JS, Wacheck S, Larsen LE. Longitudinal field studies reveal early infection and persistence of influenza A virus in piglets despite the presence of maternally derived antibodies. *Vet Res.* 2019;50(1):36.
75. Allerson M, Deen J, Detmer SE, Gramer MR, Joo HS, Romagosa A, et al. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. *Vaccine.* 2013;31(3):500–5.
76. Diaz A, Perez A, Sreevatsan S, Davies P, Culhane M, Torremorell M. Association between Influenza A Virus Infection and Pigs Subpopulations in Endemically Infected Breeding Herds. *PLOS ONE.* 2015;10(6):e0129213.
77. Ferreira JB, Grgić H, Friendship R, Wideman G, Nagy É, Poljak Z. Longitudinal study of influenza A virus circulation in a nursery swine barn. *Vet Res.* 2017;48(1):63.
78. Kyriakis CS, Rose N, Foni E, Maldonado J, Loeffen WLA, Madec F, et al. Influenza A virus infection dynamics in swine farms in Belgium, France, Italy and Spain, 2006–2008. *Vet Microbiol.* 2013;162(2–4):543–50.
79. Rajao DS, Vincent AL, Perez DR. Adaptation of Human Influenza Viruses to Swine. *Front Vet Sci.* 2019; 5:347.
80. Maldonado J, Van Reeth K, Riera P, Sitjà M, Saubi N, Espuña E, et al. Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J.* 2006;172(2):377–81.
81. Harder TC, grosse Beilage E, Lange E, Meiners C, Dohring S, Pesch S, et al. Expanded Cocirculation of Stable Subtypes, Emerging Lineages, and New Sporadic Reassortants of Porcine Influenza Viruses in Swine Populations in Northwest Germany. *J Virol.* 2013;87(19):10460–76.

82. Liang H, Lam TT-Y, Fan X, Chen X, Zeng Y, Zhou J, et al. Expansion of Genotypic Diversity and Establishment of 2009 H1N1 Pandemic-Origin Internal Genes in Pigs in China. *J Virol.* 2014;88(18):10864–74.
83. Lange J, Groth M, Schlegel M, Krumbholz A, Wiczorek K, Ulrich R, et al. Reassortants of the pandemic (H1N1) 2009 virus and establishment of a novel porcine H1N2 influenza virus, lineage in Germany. *Vet Microbiol.* 2013;167(3–4):345–56.
84. Moreno A, Di Trani L, Faccini S, Vaccari G, Nigrelli D, Boniotti MB, et al. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. *Vet Microbiol.* 2011;149(3–4):472–7.
85. Banyai K, Kovacs E, Toth AG, Biksi I, Szentpali-Gavaller K, Balint A, et al. Genome Sequence of a Monoreassortant H1N1 Swine Influenza Virus Isolated from a Pig in Hungary. *J Virol.* 2012;86(23):13133.
86. Starick E, Lange E, Fereidouni S, Bunzenthal C, Höveler R, Kuczka A, et al. Reassorted pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus discovered from pigs in Germany. *J Gen Virol.* 2011;92(5):1184–8.
87. Van Reeth K, Brown IH, Dürrwald R, Foni E, Labarque G, Lenihan P, et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza Other Respir Viruses.* 2008;2(3):99–105.
88. Anderson TK, Macken CA, Lewis NS, Scheuermann RH, Van Reeth K, Brown IH, et al. A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses. *mSphere.* 2016;1(6).
89. Kyriakis CS, Brown IH, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, et al. Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008: Virological Surveillance for Swine Influenza in Europe 2006-2008. *Zoonoses Public Health.* 2011;58(2):93–101.
90. Kanegae Y, Sugita S, Shortridge KF, Yoshioka Y, Nerome K. Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. *Arch Virol.* 1994;134(1–2):17–28.
91. Chamba Pardo FO, Wayne S, Culhane MR, Perez A, Allerson M, Torremorell M. Effect of strain-specific maternally-derived antibodies on influenza A virus infection dynamics in nursery pigs. *PLOS ONE.* 2019;14(1):e0210700.
92. Nagy A, Černíková L, Kunteová K, Dirbáková Z, Thomas SS, Slomka MJ, et al. A universal RT-qPCR assay for “One Health” detection of influenza A viruses. *PLOS ONE.* 2021;16(1):e0244669.

ANEXOS

~ Anexo I

Tabla A1.1. Descripción de la procedencia, edad del animal, y el tipo de muestra de los casos clínicos seleccionados para este estudio.

MUESTRAS SELECCIONADAS PROCEDENTES DE ESPAÑA			
Nº de muestra	C. A./Provincia	Edad del animal	Tipo de muestra
1	Aragón/ Huesca	Cebo	Pulmón
2	Castilla y León/ Ávila	Transición 7 semanas	Pool de hisopos
3	N.C./ Navarra	Transición	Pool de pulmones
4	Cataluña/ Lleida	ND	Pulmón
5	Región de Murcia/ Murcia	Lactante <21 días	Pool de hisopos
6	Com. Val./ Valencia	Cebo	Pulmón
7	Aragón/ Zaragoza	ND	Fluidos orales
8	Aragón/ Huesca	Transición	Pulmón
9	Andalucía/ Málaga	Transición 4 semanas	Fluidos orales
10	Andalucía/ Málaga	Transición 6 semanas	Fluidos orales
11	Andalucía/ Málaga	Transición	Fluidos orales
12	Cataluña/ Lleida	ND	Fluidos orales
13	Andalucía/ Málaga	Transición 7 semanas	Fluidos orales
14	Aragón/ Zaragoza	Transición 6 semanas	Pool de hisopos
15	Aragón/ Teruel	Transición 3 semanas	Fluidos orales
16	Aragón/ Huesca	Cebo	Pool de pulmones
17	Extremadura/ Badajoz	Cerda madre	Hisopos Nasales
18	Aragón/ Huesca	Transición	Pool de pulmones
19	Aragón/ Teruel	Transición 3 semanas	Fluidos orales
20	Aragón/ Teruel	Cebo	Pool de pulmones
21	Aragón/ Huesca	Cebo	Pool de pulmones
22	Región de Murcia/ Murcia	Transición 4 semanas	Fluidos orales
23	Cataluña/ Lleida	ND	Fluidos orales
24	Cataluña/ Barcelona	Lactante <21 días	Pool de hisopos
25	Cataluña/ Barcelona	Lactante <21 días	Pool de hisopos
26	Com. Val./ Valencia	Transición	Pool de hisopos
27	Región de Murcia/ Murcia	Lactante >21 días	Pool de hisopos
28	Región de Murcia/ Murcia	Lactante >21 días	Pool de hisopos
29	Andalucía/ Málaga	Transición 7 semanas	Fluidos orales
30	Andalucía/ Málaga	Transición 3 semanas	Pool de hisopos
31	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pulmón
32	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pool de pulmones
33	Cataluña/ Barcelona	Cebo	Pool de pulmones
34	Aragón/ Teruel	Transición	Pool de pulmones
35	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pulmón
36	N.C./ Navarra	Cebo	Pulmón
37	Aragón/ Huesca	ND	Pulmón
38	Aragón/ Huesca	Transición	Pool de hisopos
39	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pool de pulmones
40	Cataluña/ Barcelona	Cebo	Pulmón
41	Cataluña/ Barcelona	Cebo	Pulmón
42	Aragón/ Teruel	Transición	Fluidos orales
43	Región de Murcia/ Murcia	Transición 5 semanas	Pool de hisopos
44	Cataluña/ Barcelona	Transición 6 semanas	Pool de hisopos
45	Aragón/ Huesca	ND	Pulmón
46	Aragón/ Huesca	Lactante >21 días	Pulmón
47	Castilla y León/ Segovia	ND	Pool de lavados
48	Cataluña/ Barcelona	Transición 4 semanas	Pool de hisopos
49	Castilla-La Mancha/ Toledo	ND	Pool de hisopos

MUESTRAS SELECCIONADAS PROCEDENTES DE ESPAÑA			
Nº de muestra	C. A./Provincia	Edad del animal	Tipo de muestra
50	Castilla y León/ Ávila	Transición 3 semanas	Pool de pulmones
51	Cataluña/ Barcelona	Transición 3 semanas	Pool de hisopos
52	Extremadura/ Badajoz	Cebo	Pool de pulmones
53	Cataluña/ Barcelona	Transición Reposición	Pool de hisopos
54	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pool de pulmones
55	Castilla-La Mancha/ Toledo	Transición 5 semanas	Pool de hisopos
56	Cataluña/ Barcelona	Transición 9 semanas	Pool de hisopos
57	Castilla-La Mancha/ Albacete	Transición 5 semanas	Pool de hisopos
58	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Fluidos orales
59	Cataluña/ Barcelona	ND	Pool de hisopos
60	Cataluña/ Barcelona	ND	Pool de hisopos
61	Aragón/ Zaragoza	Transición	Fluidos orales
62	Aragón/ Zaragoza	Transición 8 semanas	Pool de pulmones
63	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pool de pulmones
64	Andalucía/ Almería	Transición 4 semanas	Pool de hisopos
65	Castilla y León/ Segovia	ND	Pool de lavados
66	Cataluña/ Tarragona	Transición	Pool de pulmones
67	Aragón/ Zaragoza	Transición 6 semanas	Fluidos orales
68	Aragón/ Huesca	Cebo	Pool de pulmones
69	Cataluña/ Lleida	Lactante >15 días	Pool de pulmones
70	Aragón/ Zaragoza	Transición 6 semanas	Fluidos orales
71	Aragón/ Teruel	Transición 6 semanas	Fluidos orales
72	Cataluña/ Girona	Transición	Fluidos orales
73	Cataluña/ Lleida	ND	Pulmón
74	Aragón/ Teruel	Transición	Fluidos orales
75	Aragón/ Huesca	Cebo	Pool de pulmones
76	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pulmón
77	N.C./ Navarra	Cebo	Pool de pulmones
78	Cataluña/ Lleida	ND	Pulmón
79	Cataluña/ Lleida	ND	RNA extraído
80	Aragón/ Zaragoza	Transición 6 semanas	Fluidos orales
81	Castilla-La Mancha/ Toledo	Transición	Pool de pulmones
82	Aragón/ Zaragoza	Transición 6 semanas	Fluidos orales
83	Aragón/ Huesca	Lactante >21 días	Fluidos orales
84	Cataluña/ Girona	ND	Pool de hisopos
85	Región de Murcia/ Murcia	Transición	Pool de hisopos
86	Cataluña/ Barcelona	Cerdas Madre	Pool de hisopos
87	Aragón/ Teruel	Transición 3 semanas	Fluidos orales
88	Aragón/ Huesca	Cebo	Fluidos orales
89	Castilla y León/ Ávila	Transición	Pool de pulmones
90	Aragón/ Huesca	Cebo	Pool de pulmones
91	Aragón/ Huesca	Cebo	Pool de pulmones
92	Cataluña/ Barcelona	Transición 7 semanas	Fluidos orales
93	Castilla y León/ Ávila	Transición	Pool de pulmones
94	Aragón/ Zaragoza	Transición	Pool de raspados
95	Andalucía/ Cádiz	Transición 5 semanas	Fluidos orales
96	Extremadura/ Badajoz	Lactante <21 días	Pool de pulmones
97	Castilla y León/ Segovia	Transición	Fluidos orales
98	Aragón/ Teruel	Transición	Fluidos orales
99	Aragón/ Zaragoza	Lactante <15 días	Fluidos orales
100	Castilla y León/ Valladolid	ND	Pool de hisopos
101	Andalucía/ Almería	Transición 6 semanas	Pool de hisopos
102	Castilla-La Mancha/ Toledo	Transición 5 semanas	Pool de hisopos
103	Aragón/ Zaragoza	Transición	Pool de hisopos
104	Castilla y León/ Segovia	ND	Pool de hisopos

MUESTRAS SELECCIONADAS PROCEDENTES DE ESPAÑA			
Nº de muestra	C. A./Provincia	Edad del animal	Tipo de muestra
105	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Fluidos orales
106	Aragón/ Huesca	Transición 3 semanas	<i>Pool</i> de pulmones
107	Aragón/ Zaragoza	Cerdas madre	<i>Pool</i> de pulmones
108	Aragón/ Zaragoza	Cebo	<i>Pool</i> de pulmones
109	Castilla y León/ Soria	Lactante >21 días	<i>Pool</i> de hisopos
110	Cataluña/ Barcelona	ND	Pulmón
111	Andalucía/ Málaga	Transición 4 semanas	Fluidos orales
112	Andalucía/ Málaga	Transición 5 semanas	Fluidos orales
113	Andalucía/ Málaga	Transición 6 semanas	Fluidos orales
114	Andalucía/ Cádiz	Transición 6 semanas	Fluidos orales
115	Andalucía/ Málaga	Transición 5 semanas	Fluidos orales
116	Castilla y León/ Segovia	Lactante >21 días	<i>Pool</i> de lavados
117	Cataluña/ Barcelona	ND	Fluidos orales
118	Aragón/ Zaragoza	Transición	<i>Pool</i> de pulmones
119	Extremadura/ Badajoz	Cebo	Pulmón
120	Com.Val./ Castellón	Cebo	<i>Pool</i> de pulmones
121	Aragón/ Huesca	Cebo	<i>Pool</i> de pulmones
122	Aragón/ Zaragoza	Cebo	<i>Pool</i> de pulmones
123	Castilla y León/ Segovia	ND	<i>Pool</i> de hisopos
124	Andalucía/ Málaga	Transición 9 semanas	Fluidos orales
125	Aragón/ Huesca	Cebo	<i>Pool</i> de pulmones
126	Aragón/ Huesca	Transición	<i>Pool</i> de pulmones
127	Cataluña/ Lleida	ND	Pulmón
128	Aragón/ Zaragoza	Transición	<i>Pool</i> de pulmones
129	Aragón/ Huesca	Cebo	Pulmón
130	Galicia/ Pontevedra	Cerdas madre	Fluidos orales
131	Cataluña/ Lleida	ND	Pulmón
132	Aragón/ Zaragoza	Cebo	Pulmón

~ Anexo II

Tabla A2.1. Subtipado del virus de la Influenza A mediante ensayos de RT-qPCR. En el caso de los positivos se muestran los valores Cq obtenidos en los ensayos de RT-qPCR.

SUBTIPADO DE MUESTRAS SELECCIONADAS POR RT-qPCR								
Nº de muestra	Cq H1av	Cq H1hu	Cq H1pdm	Cq H3	Cq H3(new)	Cq N1	Cq N2	Cq N1pdm
1	Neg	Neg	Neg	Neg	32,25	27,22	Neg	Neg
2	23,9	34,4	Neg	Neg	Neg	Neg	23,1	Neg
3	Neg	19,7	Neg	Neg	Neg	Neg	19,4	Neg
4	23,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	21,3	Neg
5	Neg	22,7	Neg	Neg	Neg	Neg	20,82	Neg
6	Neg	Neg	Neg	32,6	26,1	Neg	Neg	Neg
7	36,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
8	30,31	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	30	Neg
9	Neg	Neg	Neg	Neg	31,4	Neg	29,01	Neg
10	Neg	35,36	Neg	Neg	Neg	Neg	32,42	Neg
11	30,5	Neg	Neg	Neg	29,58	29,28	29,3	Neg
12	28,37	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,08	Neg
13	30,19	Neg	Neg	Neg	Neg	30,05	Neg	Neg
14	30,9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	30,5	Neg
15	Neg	Neg	Neg	33,9	26,2	23,1	Neg	Neg
16	31,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,5	Neg
17	Neg	Neg	31,9	Neg	Neg	31,9	Neg	33,8
18	35,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,9	Neg
19	Neg	Neg	Neg	Neg	33,3	30,3	Neg	Neg
20	26,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	26,1	Neg
21	Neg	29,3	Neg	Neg	Neg	Neg	17,6	Neg
22	30,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	26,16	Neg
23	Neg	Neg	Neg	34,01	28,3	Neg	25,98	Neg
24	Neg	26,11	Neg	Neg	Neg	Neg	27,13	Neg
25	Neg	28,53	Neg	Neg	Neg	Neg	24,03	Neg
26	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	25,02	Neg	Neg
27	Neg	30,09	Neg	Neg	Neg	Neg	24,31	Neg
28	Neg	30,61	Neg	Neg	Neg	Neg	26,57	Neg
29	33,91	Neg	Neg	Neg	34,82	30,99	37,68	Neg
30	Neg	Neg	Neg	Neg	32,1	Neg	29,44	Neg
31	Neg	24,02	Neg	Neg	Neg	Neg	23,23	Neg
32	34,94	35,47	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
33	22,33	34,34	Neg	Neg	Neg	Neg	22,31	Neg
34	Neg	Neg	Neg	Neg	29,16	Neg	23,1	Neg
35	19,03	23,83	Neg	Neg	Neg	19,89	34,3	Neg
36	Neg	22,47	Neg	Neg	Neg	Neg	18,43	Neg
37	20,07	31,9	Neg	Neg	Neg	Neg	20,3	Neg
38	27,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	25,27	Neg
39	29,61	31,65	Neg	Neg	Neg	30,52	Neg	Neg
40	31,11	Neg	Neg	Neg	Neg	33,69	Neg	Neg
41	29,94	Neg	Neg	Neg	Neg	28,4	Neg	Neg
42	Neg	Neg	Neg	Neg	29,8	28,46	Neg	Neg
43	Neg	Neg	33,21	Neg	ND	Neg	20,73	Neg
44	32,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	31,5	Neg
45	28,5	31,86	Neg	Neg	Neg	28,3	Neg	Neg
46	Neg	20,81	Neg	Neg	Neg	Neg	16,94	Neg
47	23,17	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	22,88	Neg
48	Neg	Neg	32,78	Neg	28,99	Neg	25,7	Neg
49	Neg	Neg	28,17	Neg	Neg	29,51	Neg	Neg
50	Neg	Neg	22,43	Neg	Neg	Neg	24,51	Neg

SUBTIPADO DE MUESTRAS SELECCIONADAS POR RT-qPCR								
N° de muestra	Cq H1av	Cq H1hu	Cq H1pdm	Cq H3	Cq H3(new)	Cq N1	Cq N2	Cq N1pdm
51	Neg	Neg	22,88	Neg	30,8	Neg	29,06	Neg
52	Neg	Neg	35,98	Neg	ND	27,34	Neg	ND
53	27,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	25,82	Neg
54	24,99	28,2	Neg	Neg	Neg	25,02	Neg	Neg
55	Neg	Neg	24,47	Neg	Neg	Neg	23,54	Neg
56	Neg	34,47	Neg	Neg	Neg	Neg	30,28	Neg
57	30,99	Neg	Neg	Neg	Neg	28,51	Neg	Neg
58	37,73	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	35,5	Neg
59	Neg	Neg	Neg	31,84	23,5	Neg	20,36	Neg
60	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	27,34	Neg
61	32	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	29,7	Neg
62	Neg	21,5	Neg	Neg	Neg	Neg	21,5	Neg
63	23,46	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	21,8	Neg
64	33,4	32,8	Neg	Neg	Neg	28,54	36,19	Neg
65	25,36	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	23,7	Neg
66	22,36	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	27,7	Neg
67	30,14	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	30,01	Neg
68	27,84	33,25	Neg	Neg	Neg	35,33	Neg	Neg
69	23,41	Neg	Neg	Neg	Neg	23,3	Neg	Neg
70	28,83	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,65	Neg
71	33,73	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	31,83	Neg
72	28,51	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	24,29	Neg
73	23,93	29,3	Neg	Neg	Neg	24,7	Neg	Neg
74	Neg	Neg	Neg	Neg	30,71	28,7	Neg	Neg
75	Neg	37,3	Neg	Neg	Neg	Neg	24,8	Neg
76	Neg	Neg	20,01	Neg	Neg	19,8	Neg	Neg
77	Neg	25,02	Neg	Neg	Neg	Neg	21,5	Neg
78	20,93	Neg	Neg	Neg	Neg	18,43	Neg	Neg
79	19,19	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	19,97	Neg
80	32,2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	32,5	Neg
81	Neg	Neg	27,58	Neg	Neg	Neg	26,7	Neg
82	Neg	Neg	Neg	Neg	32,87	Neg	27,9	Neg
83	33,98	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	30,66	Neg
84	Neg	Neg	Neg	Neg	29,1	Neg	23,2	Neg
85	29,76	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	31,17	Neg
86	20,89	Neg	Neg	Neg	Neg	21,94	Neg	Neg
87	Neg	Neg	Neg	Neg	29,7	26,98	Neg	Neg
88	Neg	Neg	28,51	Neg	Neg	27,42	34,8	28,82
89	27,21	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	30,04	Neg
90	22,85	24,77	Neg	Neg	Neg	20,95	Neg	Neg
91	24,5	Neg	Neg	Neg	Neg	25,21	Neg	Neg
92	Neg	Neg	Neg	Neg	31,2	Neg	25,22	Neg
93	26,72	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,41	Neg
94	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	31,13	Neg	Neg
95	28,85	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,41	Neg
96	31,53	Neg	Neg	Neg	Neg	23,12	Neg	Neg
97	35,02	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	32,54	Neg
98	Neg	Neg	Neg	Neg	31,09	29,96	Neg	Neg
99	34,89	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	31	Neg
100	Neg	Neg	Neg	Neg	30,9	26,75	Neg	Neg
101	32,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	30,45	Neg
102	28,07	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,64	Neg
103	28,43	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	27,65	Neg
104	28,54	25,44	Neg	Neg	Neg	Neg	27,13	Neg
105	26,98	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	26,26	Neg

SUBTIPADO DE MUESTRAS SELECCIONADAS POR RT-qPCR								
N° de muestra	Cq H1av	Cq H1hu	Cq H1pdm	Cq H3	Cq H3(new)	Cq N1	Cq N2	Cq N1pdm
106	23,62	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	22,42	Neg
107	Neg	Neg	19,69	Neg	Neg	22,18	Neg	Neg
108	Neg	Neg	Neg	Neg	28,56	24,18	Neg	Neg
109	33,2	Neg	Neg	Neg	31,31	32,23	30,62	Neg
110	28,85	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	25,69	Neg
111	Neg	Neg	Neg	Neg	32,7	Neg	29,88	Neg
112	31,77	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	31,52	Neg
113	Neg	Neg	Neg	Neg	29,79	Neg	27,69	Neg
114	28,41	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,56	Neg
115	36,69	Neg	Neg	Neg	29,38	27,64	28,85	Neg
116	Neg	Neg	Neg	Neg	32,7	27,39	Neg	Neg
117	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	26,06	Neg
118	29,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	27,77	Neg
119	25,95	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	22,57	Neg
120	23,52	32,79	Neg	Neg	Neg	24,04	27,66	Neg
121	Neg	24,09	Neg	Neg	Neg	Neg	19,98	Neg
122	23,09	32,36	Neg	Neg	Neg	Neg	21,49	Neg
123	Neg	Neg	Neg	Neg	28,2	23,6	Neg	Neg
124	28,94	Neg	Neg	Neg	Neg	28,95	Neg	Neg
125	23,36	33,28	Neg	Neg	Neg	Neg	21,77	Neg
126	35,07	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	32,14	Neg
127	21,28	28,19	Neg	Neg	Neg	20,75	Neg	Neg
128	25,86	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	25,95	Neg
129	27,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	27,16	Neg
130	27,31	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	32,1	Neg
131	30,82	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
132	Neg	Neg	21,87	Neg	Neg	23,91	Neg	24,82

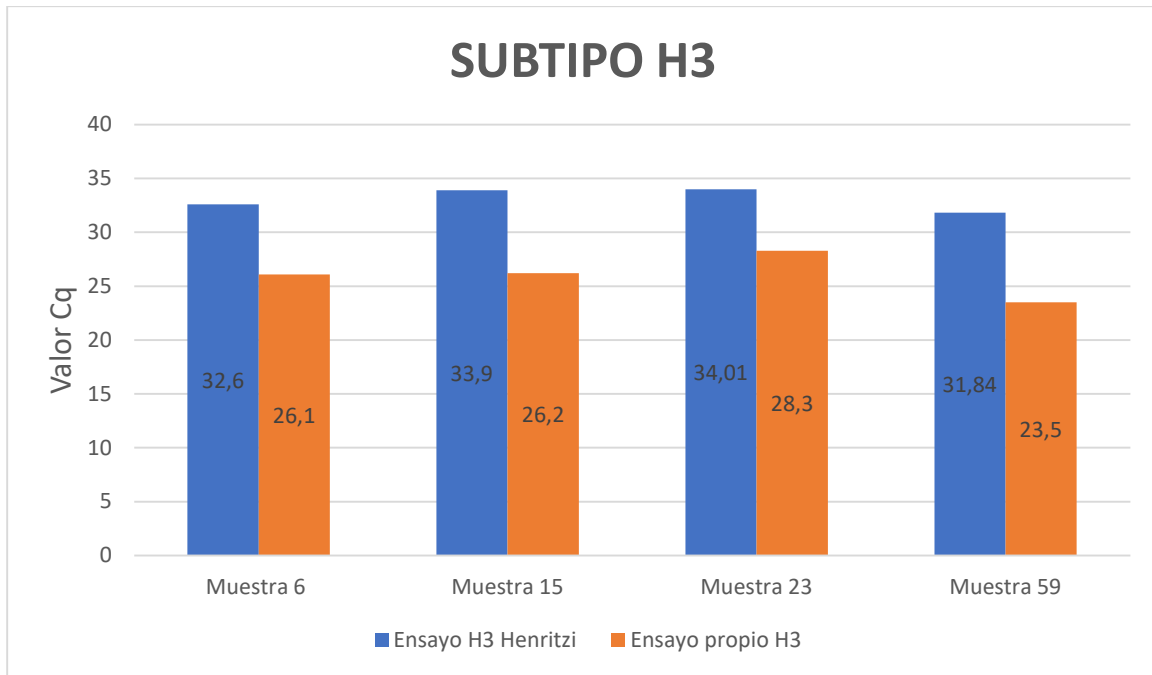


Gráfico A2.2. Comparación de los valores Cq obtenidos en las 4 muestras positivas a H3 con el ensayo de RT-qPCR descrito por Henritzi y el ensayo propio diseñado para este trabajo. A menor Cq más positiva se considera la muestra.

Tabla A2.3. Subtipo de los virus de la Influenza A identificados en las muestras evaluadas en este trabajo.

SUBTIPADO DE MUESTRAS SELECCIONADAS					
Nº de muestra	SUBTIPO HA	SUBTIPO NA	Nº de muestra	SUBTIPO HA	SUBTIPO NA
1	H3	N1	67	H1av	N2
2	H1av/H1hu	N2	68	H1av/H1hu	N1
3	H1hu	N2	69	H1av	N1
4	H1av	N2	70	H1av	N2
5	H1hu	N2	71	H1av	N2
6	H3	-	72	H1av	N2
7	H1av	-	73	H1av/H1hu	N1
8	H1av	N2	74	H3	N1
9	H3	N2	75	H1hu	N2
10	H1hu	N2	76	H1pdm	N1
11	H1av/H3	N1/N2	77	H1hu	N2
12	H1av	N2	78	H1av	N1
13	H1av	N1	79	H1av	N2
14	H1av	N2	80	H1av	N2
15	H3	N1	81	H1pdm	N2
16	H1av	N2	82	H3	N2
17	H1pdm	N1pdm	83	H1av	N2
18	H1av	N2	84	H3	N2
19	H3	N1	85	H1av	N2
20	H1av	N2	86	H1av	N1
21	H1hu	N2	87	H3	N1
22	H1av	N2	88	H1pdm	N2/N1pdm
23	H3	N2	89	H1av	N2
24	H1hu	N2	90	H1av/H1hu	N1
25	H1hu	N2	91	H1av	N1
26	-	N1	92	H3	N2
27	H1hu	N2	93	H1av	N2
28	H1hu	N2	94	-	N1
29	H1av/H3	N1/N2	95	H1av	N2
30	H3	N2	96	H1av	N1
31	H1hu	N2	97	H1av	N2
32	H1av/H1hu	-	98	H3	N1
33	H1av/H1hu	N2	99	H1av	N2
34	H3	N2	100	H3	N1
35	H1av/H1hu	N1/N2	101	H1av	N2
36	H1hu	N2	102	H1av	N2
37	H1av/H1hu	N2	103	H1av	N2
38	H1av	N2	104	H1av/H1hu	N2
39	H1av/H1hu	N1	105	H1av	N2
40	H1av	N1	106	H1av	N2
41	H1av	N1	107	H1pdm	N1
42	H3	N1	108	H3	N1
43	H1pdm	N2	109	H1av/H3	N1/N2
44	H1av	N2	110	H1av	N2
45	H1av/H1hu	N1	111	H3	N2
46	H1hu	N2	112	H1av	N2
47	H1av	N2	113	H3	N2
48	H1pdm/H3	N2	114	H1av	N2
49	H1pdm	N1	115	H1av/H3	N1/N2
50	H1pdm	N2	116	H3	N1
51	H1pdm/H3	N2	117	-	N2
52	H1pdm	N1	118	H1av	N2
53	H1av	N2	119	H1av	N2

SUBTIPADO DE MUESTRAS SELECCIONADAS					
N° de muestra	SUBTIPO HA	SUBTIPO NA	N° de muestra	SUBTIPO HA	SUBTIPO NA
54	H1av/H1hu	N1	120	H1av/H1hu	N1/N2
55	H1pdm	N2	121	H1hu	N2
56	H1hu	N2	122	H1av/H1hu	N2
57	H1av	N1	123	H3	N1
58	H1av	N2	124	H1av	N1
59	H3	N2	125	H1av/H1hu	N2
60	-	N2	126	H1av	N2
61	H1av	N2	127	H1av/H1hu	N1
62	H1hu	N2	128	H1av	N2
63	H1av	N2	129	H1av	N2
64	H1av/H1hu	N1/N2	130	H1av	N2
65	H1av	N2	131	H1av	-
66	H1av	N2	132	H1pdm	N1pdm

~ Anexo III

Tabla A3.1. Secuencias de referencia seleccionadas para los genes HA y NA del virus de la Influenza A.
Todas las secuencias se encuentran depositadas en la base de datos GenBank.

Tipo de HA	Nº acceso GenBank	Región Geográfica	Tipo de NA	Nº acceso GenBank	Región Geográfica
H1av	CY009892	España	N1	MN932220	España
H1av	CY010572	España	N1	MN932229	España
H1av	MN932208	España	N1	MN932219	España
H1av	KR700153	España	N1	MN932216	España
H1av	MN932181	España	N1	JF960172	España
H1av	MN932178	España	N1	JF960192	España
H1av	MN932170	España	N1	KR699990	Países Bajos
H1av	KR700597	España	N1	KR700833	Países Bajos
H1av	MN932182	España	N1	KR699665	Alemania
H1av	KR699876	Países Bajos	N1	KR699846	Italia
H1av	KR700891	Bélgica	N1	CY084883	Hong Kong
H1av	KR699687	Alemania	N1pdm	MN932225	España
H1av	KR700823	Bélgica	N1pdm	MN932215	España
H1av	MW048844	Francia	N1pdm	MN932228	España
H1av	KR700485	Polonia	N1pdm	JQ253795	Noruega
H1av	MT666689	Dinamarca	N1pdm	MK303332	Francia
H1hu	MN932211	España	N1pdm	KU323167	Italia
H1hu	MT379206	Francia	N2	CY009382	España
H1hu	KR700875	Alemania	N2	MN933424	España
H1pdm	MN932201	España	N2	MN933435	España
H1pdm	MN932198	España	N2	JX908107	España
H1pdm	MN932195	España	N2	MN933412	España
H1pdm	GQ464408	España	N2	KR700594	España
H1pdm	GQ303340	Méjico	N2	JF960171	España
H1pdm	KR701105	Países Bajos	N2	JX908139	España
H1pdm	MW262678	Bélgica	N2	KR700713	Inglaterra
H1pdm	CY067662	Italia	N2	KR699934	Bélgica
H3	MN929029	España	N2	KU322572	Italia
H3	MN929030	España	N2	KR701211	Países Bajos
H3	MN929037	España	N2	KR700511	Países Bajos
H3	MN929035	España	N2	KR700360	Alemania
H3	KR701447	España			
H3	KR701463	España			
H3	KR701471	Países Bajos			
H3	KR701407	Alemania			
H3	KR701257	Países Bajos			
H3	KR701399	Alemania			
H3	KR701241	Bélgica			

Tipo de HA	N° acceso GenBank	Región Geográfica	Tipo de NA	N° acceso GenBank	Región Geográfica
H3	KR701344	Bélgica			
H3	CY118818	Malasia			

~ Anexo IV

Secuencias completas de los genes HA y NA de dos casos del estudio mediante secuenciación de Sanger. La nomenclatura de las secuencias se basa en el número de caso clínico seguido del tipo HA o NA y de la provincia de la que proceden.

>065_H1av_Segovia

ATGAAAGCAAAATTGTTTGTACTGTTCTGTGCATTCACTGCACTAAAAGCCGACACCATTTGTGTAG
GCTATCATGCTAATAATTCTACAGACACAGTCGACACAATACTGGAGAAAAATGTGACTGTTACCC
ATTCAGTTAATTTACTAGAAAACAGCCACAATGGAAAACATATGCAGTCTGAATGGAAAGGGCCCAT
TACACCTGGGAAACTGCAACGTAGCAGGATGGATCCTGGGCAATCCGGAATGTGATTTGCTGCTCA
CAGCAAATTCGTGGTCTTACATAATAGAGACTCCAAATTCAAAAAATGGAACATGCTATCCTGGAG
AATTCGCTAATTATGAAGAATTAAGGGAACAGCTGAGTACAGTTTCTTCATTTGAAAGATTTGAAA
TTTTCCCAAAGGCAACATCATGGCCAAATCATGAAATCACCAAAGGTACTACAGTTGCATGCTCCC
ACTCTGGATCCAAAAGCTTCTATCGGAACTTGCTATGGATAGTAAAAAAGAAAACCTCTATCCTA
AGCTCAGCAATTCTTACACAAACAACAAGGGAGAGAAGTACTCGTGGTCTGGGGAGTGCACCAC
CCACCAACTGTCAGTGATCAACAAACCCTCTACCAGAATAATCATAATATCTCAGTTGTATCAT
CAAAATATTACCAAAGATTCACACCAGAAATAGTAACAAGACCTAAAGTCAGAGAGCAAGCGGGT
AGGATGAACTACTATTGGACACTGTTAGATCAAGGAGACACCATAACTTTTTGAAGCCACAGGGAAT
TTGATAGCACCATGGTATGCATTTGCATTGAACAAGGGCTCTAATTCTGGAATTATGATGTCTGATG
CTTACGTTCACAATTGCACTACAAGGTGCCAAACCCCTCTCGGGGCTTTGAAGAGCAATCTTCCTTT
TCAGAATGTACACCCCATCACTATTGGAGAATGCCAAAATATGTTAAAAGCACCAACTAAGAAT
GGCAACAGGATTGAGGAACATCCCCTCTATCCAATCCAGAGGACTTTTTGGGGCAATTGCCGGATT
CATTGAAGGAGGATGGACAGGAATGATAGATGGATGGATATCACCATCAAAATGAGCAAG
GATCTGGTTACGCAGCAGATCAAAAAGCACACAATCGCAATTGACGGAATCAGCAACAAGTG
AACTCAGTAATTGAGAAAATGAATGCTTAATTTATTTTCAGTGCAGGGAATTCAATAACTAGAA
AAAAGGATCGAAAATTTAAATAAGAAAGTTGATGATGGATTCTTAGATGTATGGACATATAACGCT
GAATTATTAATTTTGGCTTGAGAACGAAAGGACCCTAGATTTCCATGACTTTAACGTGAGAAATTTAT
ATGACAAGGTCAAATCACAATTGAGAAAATAATGCCAAGGAAATCGGCAATGGCTGTTTTGAGTTCT
ATCACAATGTGATAATGAATGCATGGAAAGCGTGAAGAATGGCACATATAATTATCCCAGATATT
CAGAAGAATCCAAATGAAATAGAGAAGAAATAGACGGTGTGAAGCTAGAATCAGTGGGAGTTCAT
CAGATTTTGGCGATCTACTCCACAGTCGCCAGTTCCTGGTGTACTAGTCTCCCTGGGGCAATCA
GCTTCTGGATGTGCTCTAATGGTTCATTGCAGTGCAGAATATGCATTTAA

>065_N2_Segovia

ATGAACCCAAATCAAAAGATAATAACAATTGGCTCTATTTCTCTCATCATTGCCACATTGTGCTTTC
TCATGCAGATGGCCATTCTAATAACAACACTGTAATAATTACATTACAAACAATATGAGTGCAGTACC
CTGCAAACAATCAAGTGATAACATGTGAGCCACTAATAATAGAAAGGAACACAACGAAGATAGTG
CACTTAGCCAACATCACCATAGAGAAAGGAACATGCCCAAAACAGTGGAGTACAGAAATTGGTC
AAAGCCTCAATGCAAAATCACAGGGTTTTGCACCTTTTTCTAAGGACAATTCAATACGGCTTTCTGCT
GGAGGGGACATTTGGGTTACTAGGGAACCTTATGTGTCTTGCGAACCCAGCAAATGTTATCAATTT
GCACTTGGGCAAGGGACCACACTAGACAACAACATTCAAATGACACAATACATGACAGAACCCC
TTATCGAACTCTACTGATGAATGAGTTGGGTGTTCCATTTTCAATTTAGGAACACGGCAAGTATGTATA
GCGTGGTCCAGCTCAAGTTGTTATGATGGGAAAGCATGGCTGCATGTCTGTATCACTGGACATGAT
AAAAATGCAACTGCCAGCTTCATATACGATGGTAGACTTGTAGACAGCATTGGTTCATGGTCTAAG
AATATCCTTAGAACCAGGAATCAGAATGCGTTTGTATCAACGGGACATGTACAGTAGTTATGACC
GATGGAAGTGCTTCAGGAAAAGCTGATACTAAAATACTATTCATTGAAGAAGGGAAAATTATCCAT
ATTAGTCCATTGGCAGGGAGTGCCCAACATGTAGAGGAGTGCTCCTGTTATCCCAGATATCCTGGG
GTAAGGTGTGTTTGCAGGGACAACACTGGAAAGGTTCTAACAGGCCCGTTGTAGATATAAATATAGAG
GATTATAGCGTTGATTCCAGTTATGTATGTTTCGGGGCTTGTCTGGTGACACACCCAGAAACAATGAT
AGATCCAGTAGTAGTTATTGCCTTAATCCTAACAATGAGAAAGGAAGTCACGGAGTGAAGGGTTG
GGCCTTTGACGATGGAAATGATGTGTGGATGGGAAGAACGATCAACGAAGATTCACGGTCAGGCT
ATGAGACATTCAAAGTCATTGGTGGTTGGTCCACACCTAATTCCAAATTGCAGATAAATAGGCAAG
TAATAGTTGACAGTGAATAAGGTCAGGTTATTCTGGTGTCTTCTCCGTTGAAGATAAAAGCTGCA
TCAATAGATGTTTCTATGTGGAGCTGATAAGGGGAAGAAGACCAGAAGAGAGAGTCTGGTGGACT
TCAAACAGTATTGTTGTGTTTTGTGGCACTTCAGGTAATGGAACAGGCTCATGGCCTGATGGAG
CAGACATCAATCTCATGCCTATATAA

>076_H1pdm_Zaragoza

ATGAAGGCAATATTAGTAGTTCTGCTGTATACATTTACAACCGCAAATGCAGACACATTATGTATA
GGTTATCATGCGAACAAATCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAAC
ACACTCTGTCAATCTTCTGGAAGACAAGCATAACGGAAAACCTATGCAAACCTAAGAGGGGTAGCCC
CATTGCATTTGGGTAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCT
CCACAGCAAGGTCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAATTCAGAAAATGGAACGTGTTACCCAG
GAGATTTTCATCAATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTATCATTGAAAGGTTTG
AAATATTCCTCAAGACAAGTTTCATGGCCTAATCATGACTCGGACAAAGGTGTAACGGCAGCATGTC
CTCAGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAACTTGATATGGCTGGTTAAAAAAGGAAATTCATACC
CAAAGCTCAACCAACCTACATTAATGATAAAGGAAAGAAGTCTCTCGTGTCTGTGGGGCATTACCC
ATCCACCTACTATTGCTGCCAAGAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTTGTGGGGAC
ATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGAAATAGCAACAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAA
GGGAGAATGAACATACTGGACACTAGTAGAACCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGG
AAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCACAATGGAAAGAGATGCTGGATCTGGTATTATCATTTC
AGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTACAGACACCCGAGGGTGCTATAAACACCAGCCT
CCCATTTCAGAATGTACATCCGATTACAATTGGGAAATGTCCAAAGTATGTA AAAAGCACAAAATT
GAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGGGGCCTATTCGGGGCCATTGC
TGGCTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAAATG
AGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGATCTGAAGAGCACACAAAATGCCATTGATAAGATTACTAAC
AAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTGGGTAAAGAGTTCAACCAC
CTTGAAAAAAGAATAGAGAATCTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCTGGACATTTGGACTTAC
AATGCCGAACTGTTGGTTCTACTGGAAAACGAAAGAACTTTGGACTATCACGATTCAAATGTGAAG
AACTTGTATGAAAAAGTAAGAAACCAGTTAAAAACAATGCCAAGGAAATTGGAACCGGCTGCTT
TGAATTTTACCACAAATGCGACAACACATGCATGGAAAGTGTCAAGAATGGGACTTATGACTACCC
AAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAAAAATAGATGGAGTAAAGCTGGAATCAACA
AGGATCTACCAGATTTTGGCGATCTATCAACTGTTGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGG
GGCAATCAGCTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

>076_N1_Zaragoza

ATGAATCCAAATCAAAAAGATAATAATCATTAGTTCGATCTGCATGATAAATGGAATTGCCAGCTTG
ATGTTACAAATTGGGAACATAATCTCAATATGGATTAGCCATTCAAATTCAAATTGGGAACCAAAAC
CAAACCTGAAACATGCAGTCAAAGTGTCACTTATGAAAACAAAACCTTGGGTAAATCAGACATAT
GTCAATATCAGCAATATCAATTTTGTGATGGACAGACAGTACTTCAGTGTATTTAGCGGGCAGT
TCTCCTCTCTGCCCTGTTAGTGGGTGGGCTATATACAGTAAAGATAACAATGTAAGAATTGGTTCCA
GAGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAACCATTCAATATCATGCTCCCACTTAGAATGTAGAACTTTCTT
CTTGACCCAAGGGGCTTTGCTGAACGACAAAACATTCCAATGGAACCATTAAGACAGAAGTCCTTA
TCGAACCCTGATGAGCTGCCCTATTGGCGAAGTCCCCTCCCCGTACAACCTCAAGATTTGAATCAGTT
GCCTGGTCAGCAAGCGCTTGCCATGATGGCACCAATTGGTTGACAATTGGGATTTCTGGCCCAGAC
AATGGGGCAGTAGCTGTATTGAAATACAATGACGTGATTACAGACACTATCAAGAGTTGGAAAAA
CAACATATTAAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGCGTGAATGGTTCTTGTCTTACTGTAATGAC
CGATGGACCAAGTAATGGGCAGGCCTCATACAAGATCTTCAAGATAGAAAAGGGGAAAGTAGTAA
AGTCAGTCGAATTAGATGCACCTAATTACTATGAGGAATGTTCTGTTATCCAGATTCTGGTGA
AATCATATGTGTATGCAGGGACAATTGGCATGGCTCGAACCGACCATGGGTGTCTTTCAATGAGAA
TCTAGAGTATCAAACAGGATATATATGCAGTGGGATTCTTGGAGACAATCCGCGCCCCAATGATAG
AATAGGCAGCTGTGGTCCGGTATCAACTAATGGGGCAAATGGGGTAAAAGGGTTTTCTGTTAAATA
CGGCAATGGTGTGGATAGGGGAACTAAAAGCACTAGTGAAGGAGTGGGTTTTGAAATGATTT
GGGACCCAAACGGTTGGACAGAAACAGACAATAACTTCTCAGTAAAGCAAGATATCGTAGGGGTA
AATGACTGGTCAGGATACAGCGGAAGTTTTGTTTCAGCATCCAGAACTAACCGGACTGAATTGTATG
AGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGAGGCCCAAAGAGAAACACAATCTGGACTAGTGG
GAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTGAATAGTGACACGGTGAGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGA
GTTGCCATTCACTATTGACAAGTAA

~ Anexo V

Tabla A5.1. Matriz de identidad de las secuencias nucleotídicas (en %) de los virus de tipo H3. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de tipo H3 del gen HA.

	108	084	059	082	111	009	113	019	087	100	116	123
108	100,0											
084	97,8	100,0										
059	98,1	98,6	100,0									
082	97,7	98,3	98,5	100,0								
111	97,5	98,4	98,6	98,4	100,0							
009	98,4	99,0	99,2	98,9	98,8	100,0						
113	98,3	98,6	98,9	98,5	98,4	99,4	100,0					
019	97,4	97,9	98,1	97,7	97,7	98,4	98,0	100,0				
087	97,4	97,7	98,1	97,6	97,5	98,3	98,0	99,9	100,0			
100	97,3	98,0	98,0	97,6	97,8	98,3	97,9	97,8	97,7	100,0		
116	97,0	97,8	97,7	97,3	97,7	97,9	97,6	97,7	97,4	99,7	100,0	
123	97,1	97,8	97,7	97,3	97,7	97,9	97,6	97,7	97,4	99,7	100,0	100,0

108_H3b_Zaragoza
 084_H3b_Girona
 059_H3b_Barcelona
 082_H3b_Zaragoza

111_H3b_Malaga
 009_H3b_Malaga
 113_H3b_Malaga
 019_H3b_Teruel

087_H3b_Teruel
 100_H3b_Valladolid
 116_H3b_Segovia
 123_H3b_Segovia

~ Anexo VI

Tabla A6.1. Matriz de identidad de las secuencias nucleotídicas (en %) de los virus de tipo N2. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de tipo N2 del gen NA.

	114	020	113	059	048	082	084	005	031	036	046	065	062	061	072	053	101	050	119	022	102	056	055	
114	100,0																							
020	90,5	100,0																						
113	91,6	92,0	100,0																					
059	91,6	92,4	97,8	100,0																				
048	91,8	93,0	98,0	98,0	100,0																			
082	92,0	92,8	97,9	98,3	98,9	100,0																		
084	91,8	93,0	97,9	97,8	98,3	97,9	100,0																	
005	92,0	91,8	93,5	93,8	94,1	93,8	94,2	100,0																
031	92,1	91,4	93,5	93,7	94,0	93,5	93,9	99,1	100,0															
036	91,9	91,5	93,3	93,5	93,7	93,5	93,7	98,9	98,9	100,0														
046	92,1	92,1	93,5	93,9	94,1	94,1	94,0	99,2	99,2	99,1	100,0													
065	91,6	91,5	93,7	94,0	94,2	93,9	94,2	97,0	97,1	96,7	97,0	100,0												
062	81,6	82,1	81,6	82,1	81,9	82,2	82,3	82,6	82,5	82,6	82,5	83,0	100,0											
061	81,2	81,5	80,7	81,8	81,3	81,4	81,8	82,6	82,9	83,0	83,0	82,7	95,6	100,0										
072	81,4	81,9	81,7	82,0	82,0	82,4	82,4	82,8	82,8	82,7	82,6	83,3	95,6	94,5	100,0									
053	82,8	82,6	82,3	82,8	82,7	82,8	83,1	83,5	83,5	84,2	83,9	83,9	95,7	94,9	95,9	100,0								
101	82,0	81,8	81,3	82,0	81,6	81,7	82,2	82,7	83,0	83,1	83,1	82,9	94,7	94,4	95,1	95,9	100,0							
050	81,8	81,6	81,2	81,6	81,5	81,5	81,9	82,3	82,3	82,4	82,7	82,2	94,1	93,6	94,5	95,3	94,2	100,0						
119	82,2	81,8	81,8	82,2	82,0	82,1	82,4	83,1	83,1	83,2	83,5	83,3	94,9	94,1	95,3	95,9	94,2	98,1	100,0					
022	80,7	80,3	79,4	80,2	80,1	80,0	79,9	80,9	80,9	81,4	81,3	80,7	89,6	89,4	91,1	92,0	90,0	90,7	90,4	100,0				
102	81,7	81,0	80,4	81,3	81,0	81,1	81,0	82,2	82,2	82,6	82,6	82,4	91,3	90,5	92,1	92,6	91,5	90,5	91,0	90,1	100,0			
056	82,2	82,5	81,7	82,2	82,2	82,4	82,2	83,3	83,3	83,7	83,7	83,6	90,2	89,8	90,8	92,3	90,5	89,8	90,1	89,1	90,1	100,0		
055	83,1	83,2	81,7	82,8	82,4	82,4	82,7	82,9	82,9	83,4	83,4	83,2	89,6	89,0	89,4	90,2	88,8	89,2	89,1	87,3	89,0	89,8	100,0	

114_N2_Cadiz

020_N2b_Teruel

113_N2_Malaga

059_N2_Barcelona

048_N2_Barcelona

082_N2b_Zaragoza

084_N2_Girona

005_N2_Murcia

031_N2_Zaragoza

036_N2_Navarra

046_N2_Huesca

065_N2_Segovia

062_N2_Zaragoza

061_N2b_Zaragoza

072_N2_Girona

053_N2b_Barcelona

101_N2b_Almeria

050_N2b_Avila

119_N2b_Badajoz

022_N2b_Murcia

102_N2b_Toledo

056_N2b_Barcelona

055_N2b_Toledo

~ Anexo VII

Tabla A7.1. Matriz de identidad de las secuencias nucleotídicas (en %) de los virus de tipo N1. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso de tipo N1 del gen NA.

	096	100	123	116	124	108	076	078	087	091	035	127	132
096	100,0												
100	88,7	100,0											
123	89,9	99,7	100,0										
116	89,9	99,7	100,0	100,0									
124	88,7	89,1	89,5	89,6	100,0								
108	90,2	90,3	90,6	90,6	91,6	100,0							
076	88,7	87,9	88,9	88,9	87,9	89,6	100,0						
078	86,8	86,5	87,4	87,4	85,7	87,4	86,3	100,0					
087	87,0	87,2	88,4	88,4	86,5	88,0	86,6	94,8	100,0				
091	86,3	86,5	87,7	87,7	86,2	87,7	86,3	94,0	96,1	100,0			
035	88,2	87,5	87,7	87,7	87,9	87,7	88,6	94,6	96,6	96,1	100,0		
127	87,3	86,7	86,7	86,7	86,7	87,1	87,8	93,6	96,0	95,2	95,9	100,0	
132	86,2	86,5	87,6	87,7	86,3	87,0	86,9	87,2	88,2	87,1	88,4	88,2	100,0

096_N1_Badajoz 124_N1_Malaga 087_N1_Teruel 132_N1pdm_Zaragoza
 100_N1_Valladolid 108_N1b_Zaragoza 091_N1_Huesca
 123_N1b_Segovia 076_N1_Zaragoza 035_N1b_Zaragoza
 116_N1b_Segovia 078_N1_Lleida 127_N1b_Lleida