

INFLUENZA A: BIOLOGÍA, VACUNAS, Y ORIGEN DEL VIRUS PANDÉMICO A/H1N1

Susana López y Carlos F. Arias

Instituto de Biotecnología/UNAM, Campus Morelos

Influenza A: Biología, vacunas, y origen del virus pandémico A/H1N1

Resumen

En este capítulo presentamos lo que se conoce de la biología molecular del virus de influenza en relación a su estructura y a la composición y función de su genoma y proteínas. Basados en este conocimiento explicamos por qué los virus de influenza tienen una alta tasa de mutación y capacidad para generar virus nuevos con facilidad. Con base en el conocimiento que se ha generado sobre la biología del virus, resumimos lo que se sabe acerca de factores virales de patogenicidad y virulencia y también acerca del origen filogenético de la cepa pandémica A/H1N1/2009. Finalmente, se describe brevemente la producción de vacunas, las cuales representan la mejor medida actual de protección contra la infección por este virus.

Palabras clave: Influenza, vacunas, patogenicidad, marcadores de virulencia.

Summary

In this chapter we discuss what is known about the molecular biology of influenza virus in relation to its structure and to the composition and function of its genome and proteins. Based on this knowledge, we explain why influenza viruses have a high mutation rate and an unusual high capacity to generate new viral variants. Also based on what is known about the biology of these viruses we summarize what is known about the pathogenicity and virulence determinants of these viruses and also about the phylogenetic origin of the A/H1N1/2009 strain. Finally we briefly discuss about the production of vaccines, which represent the best protection method against the infection by this virus.

Keywords: Influenza virus, vaccines, pathogenicity, virulence determinants

Introducción

Los virus de influenza se clasifican en tres tipos: A, B, y C. Los virus de influenza tipo A, infectan una amplia variedad de aves y mamíferos y se dividen en subtipos. Estos virus han sido causantes durante el siglo pasado de tres pandemias, como se les conoce a las epidemias que se extienden a más de un continente. Los virus de influenza B, sólo infectan humanos y existe un solo subtipo de ellos por lo que tienen un bajo potencial de causar pandemias, aunque sí pueden provocar enfermedades respiratorias serias. Los virus de influenza C, infectan a humanos y cerdos, causan enfermedades respiratorias leves y han sido poco estudiados (22, 26).

Cada año se enferman alrededor de 500 millones de personas a nivel mundial por virus de influenza A, de los cuales entre 3 y 5 millones se convierten en casos graves que llevan a alrededor de 300 mil defunciones. Estos casos de influenza ocurren regularmente durante los meses fríos de cada año y se conocen como epidemias o brotes de influenza estacional (22).

Desde 1977 circulan estacionalmente en la población humana dos subtipos de virus de influenza A, conocidos como H1N1 y H3N2, por las proteínas presentes en su superficie, junto con virus de influenza B. La frecuencia de estos tres grupos de virus varía de manera temporal y geográfica.

Los virus de influenza tipo A tienen dos clases de proteínas en su superficie, que se conocen como H (por hemaglutinina) y N (por neuraminidasa) (figura 1), que son los principales determinantes de patogenicidad del virus. En la naturaleza existen 16 subtipos diferentes de H (H1 a H16) y 9 de N (N1 a N9) (26).

Las aves silvestres acuáticas, como patos y gaviotas, entre otras, son el reservorio natural más importante de estos virus. En este tipo de aves circulan todos los subtipos de H y N, y se piensa que las aves silvestres son la fuente de los virus que se transmiten a los demás animales, incluyendo aves de corral. Muchos de los subtipos de virus de influenza A infectan a las aves de manera asintomática, esto es, sin causar la enfermedad, o bien causan síntomas moderados; sin embargo, hay infecciones con algunos virus; por ejemplo de los subtipos H5 y H7, que pueden causar enfermedad severa y muerte en algunas especies de aves silvestres y domésticas, tales como pollos y pavos. Los cerdos también son reservorios naturales de virus de influenza A, aunque sólo den unos pocos subtipos. Al igual que en el caso de las aves, algunas cepas de influenza infectan a los cerdos de manera asintomática, mientras que otras pueden causar en estos animales síntomas similares a los que se presentan en humanos, tales como tos, fiebre y secreción nasal (26).

Estructura del virus de la Influenza

El virus de la Influenza pertenece a la familia Orthomixoviridae. Al microscopio electrónico estos virus tienen una apariencia pleomórfica, con un diámetro promedio de 100 nm (una diezmilésima parte de un milímetro). La partícula viral está envuelta por una bicapa de lípidos en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas H y N y pequeñas cantidades de la proteína transmembranal M2. Al interior de la bicapa lipídica se encuentra una capa de proteína formada por la proteína de matriz M1, la cual contiene en su interior el genoma viral. El genoma del virus está recubierto por la nucleoproteína NP, y además está asociado a la RNA polimerasa viral, la cual es un complejo protéico formado por dos subunidades básicas (PB1, PB2) y una ácida (PA) (1, 18) (Figura 1).

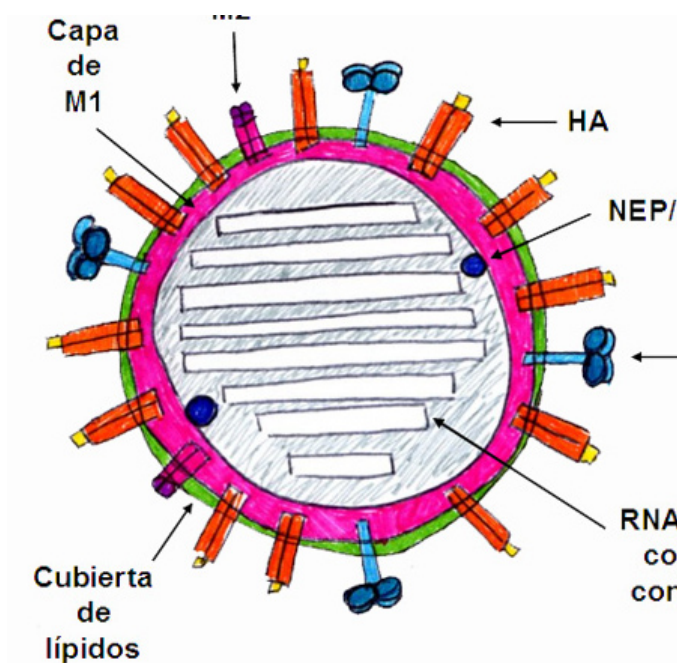


Figura 1.

El genoma viral consta de ocho segmentos de RNA de cadena sencilla de polaridad negativa, con tamaños que van de 890 a 2,350 nucleótidos, con algunas variaciones dependiendo de la cepa de virus. En total, el genoma tiene aproximadamente 13,600 nucleótidos y codifica por once proteínas virales. Todos los

segmentos codifican por una proteína, con excepción del gen de PB1, que en algunas cepas codifica además por la proteína PB1-F2; el gen de la proteína de matriz, que codifica por dos proteínas, M1 y M2, y el gen más pequeño, NS, el cual codifica por las proteínas NS1 y NS2 (18, 22).

Variación Antigénica

Los virus de influenza sufren constantes variaciones antigénicas en sus proteínas H y N, que les permiten escapar a la respuesta inmune del huésped. A diferencia de otros virus respiratorios, los virus de influenza tienen dos mecanismos principales de variación antigénica, los cuales se conocen como deriva y cambio antigénicos.

La deriva antigénica es debida a las mutaciones puntuales, cambios en nucleótidos individuales, que ocurren durante la replicación del genoma viral como resultado de los frecuentes errores de copiado de la RNA polimerasa del virus. La infidelidad de la replicación del RNA viral resulta en una tasa de mutación de aproximadamente un cambio por cada genoma copiado (7.3×10^{-5} mutaciones/nucleótido replicado) (5). En los virus de influenza A las tasas de evolución son diferentes para cada segmento, lo cual probablemente refleja la diferente presión de selección por parte del huésped para cada proteína. Los genes de la hemaglutinina, la neuraminidasa y la M2, evolucionan más rápidamente que los demás. Se ha calculado que la tasa de evolución, esto es, la fijación de mutaciones de las proteínas H y N es alrededor del 1% anual. La acumulación de estos cambios en las proteínas de superficie del virus llega a un punto en que el sistema inmune de las personas previamente infectadas con un virus determinado, ya no reconoce a las proteínas H y N de ese virus, es por esta razón que cada año se revisa la composición de los tipos de virus que se incluirán en la vacuna estacional y es necesario vacunarse anualmente.

El segundo tipo de variación que sufren estos virus es el cambio antigénico, el cual se ve favorecido por la naturaleza segmentada del genoma viral. Esta característica del genoma de influenza facilita que cuando dos virus con diferentes subtipos de H y N infectan a un mismo animal, los genes de ambos virus puedan mezclarse y producirse nuevos virus, conocidos como rearreglantes por haber experimentado un rearreglo de genes, con combinaciones de H y N diferentes a las de los virus originales (figura 2). Este es un cambio antigénico brusco que puede resultar en la introducción de un nuevo subtipo de H y/o de N en la población humana. Cuando esto sucede, los nuevos subtipos de H y/o N pueden representar proteínas inmunológicamente diferentes a la de las cepas que estaban en circulación. Si este fuera el caso, usualmente se da una alta incidencia de infección en la población que no tiene anticuerpos contra la nueva cepa de virus, generándose potencialmente una pandemia.

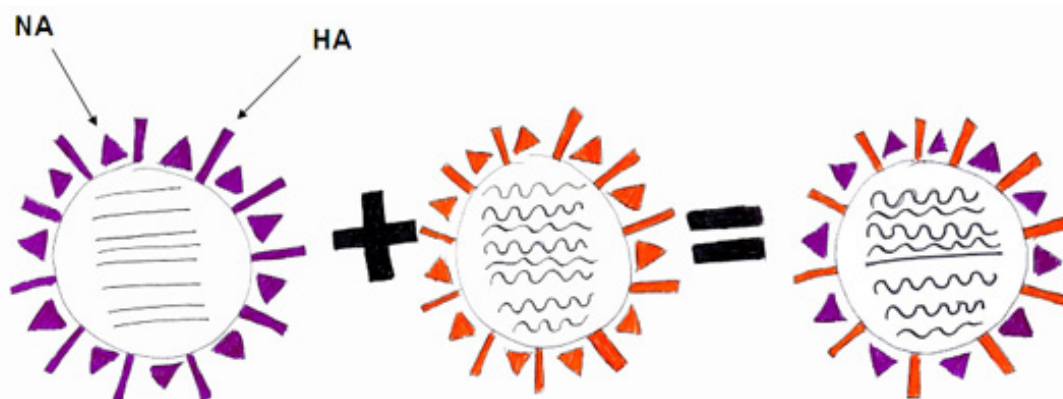


Figura 2.

El intercambio de genes entre dos virus de diferente subtipo, generalmente provenientes de diferentes especies animales, se ven facilitados en los cerdos, ya que a diferencia de las aves, que generalmente no son infectadas por virus de influenza A de origen humano, y viceversa, los cerdos se pueden infectar con virus de origen aviar, humano y por supuesto, porcino. Así, cuando un cerdo se infecta al mismo tiempo con dos virus de diferentes especies, por ejemplo de patos y humanos, se convierte literalmente en un recipiente de mezclado de genes, en el cual pueden generarse virus nuevos.

En el siglo pasado aparecieron tres cambios antigénicos en los virus de influenza A, circulantes en humanos que fueron responsables de sendas pandemias: en 1918, con la aparición de un virus H1N1; en 1957, cuando el virus H1N1 fue reemplazado por un virus de subtipo H2N2; y en 1968, cuando un virus H3N2 reemplazó al subtipo H2N2. En 1977 reapareció el subtipo H1N1 en humanos, aunque en este último caso el virus H1N1 no resultó en una pandemia y no reemplazó al subtipo circulante H3N2, por lo que ambos subtipos (H1N1 y H3N2) co-circulan hasta nuestros días en todo el mundo y son los responsables de causar los brotes estacionales que se presentan cada año durante la temporada invernal (26).

Las pandemias de 1957 y 1968 resultaron del intercambio de genes entre virus de origen humano y aviar. El origen del virus que causó la pandemia de 1918 es todavía controversial. La caracterización de la secuencia del genoma del virus reconstruido por métodos de ingeniería genética sugirió que éste había pasado directamente de aves a humanos (23); sin embargo, datos recientes indican que los componentes genéticos de este virus pandémico circulaban en cerdos y en humanos desde 1911, por lo que parece poco probable que haya sido un virus de aves el que se haya introducido a la población humana poco antes de la pandemia de 1918 (20).

Los estudios filogenéticos que se han llevado a cabo utilizando decenas de secuencias genómicas del virus A/H1N1/2009 aislados en diferentes partes del mundo, indican que este virus es de origen porcino, ya que sus genes han estado presentes en linajes de virus que han circulado en cerdos por al menos los diez últimos años (7, 20, 24).

El precursor inmediato del actual virus pandémico es un virus triple rearreglante que circula en la población porcina de Norteamérica y Eurasia, el cual adquirió los genes de la N y de la proteína M de un virus de cerdo Eurasiático (7, 20, 24). El origen de cada uno de los genes del nuevo virus A/H1N1/2009 se muestra en la figura 3. No se conoce el lugar geográfico ni el momento en que ocurrió el evento de intercambio de genes (rearreglo) entre los dos virus descritos para dar origen al nuevo virus pandémico, aunque se piensa que el virus A/H1N1/2009 pudo haber estado circulando en cerdos por años, sin haberse detectado antes de transmitirse a humanos (20). Los estudios filogenéticos también sugieren que la transmisión del virus de cerdos a humanos ocurrió en algún momento durante el segundo semestre del 2008, en un lugar del orbe no determinado, varios meses antes de que las autoridades de salud de México lo detectaran y dieran la alerta en abril de 2009 (6, 20).

Anatomía del virus de influenza A/H1N1-2009

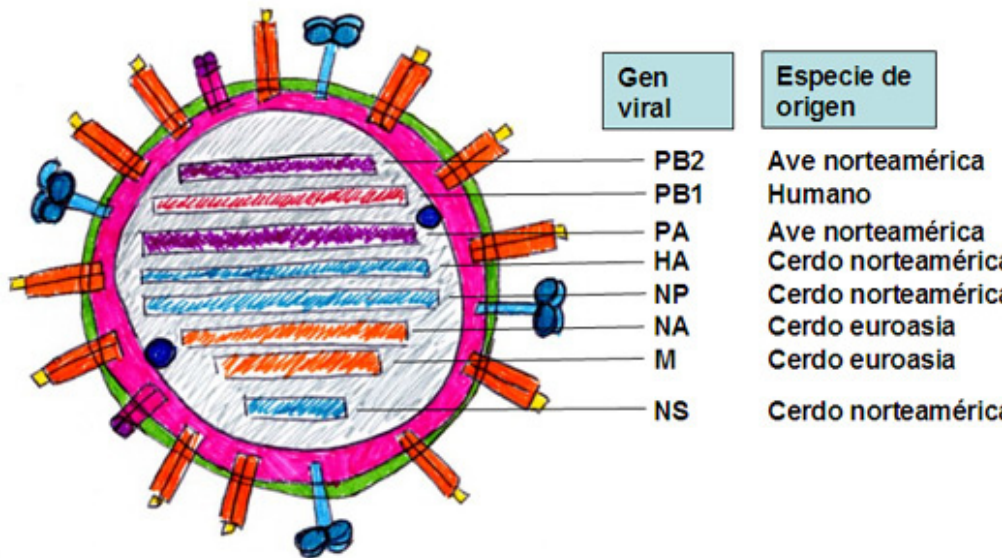


Figura3.

Tropismo Viral

En humanos, el virus normalmente ingresa al organismo por nariz o boca e infecta las células que recubren el tracto respiratorio, uniéndose a ácido siálico (AS) en la superficie de las células para iniciar la infección. El AS es una molécula muy abundante en todas las células, que forma parte de cadenas de azúcares unidas a proteínas o lípidos, y define el tropismo de los virus de influenza. Esto ocurre debido a la especificidad que tienen diferentes cepas de virus por diferentes tipos de enlaces del AS con el azúcar, que los precede en la cadena de carbohidratos, que generalmente es galactosa. Así, los virus aislados de humanos se unen, preferentemente, a ácidos siálicos en unión $\alpha_{2,6}$ con la galactosa, mientras que los virus aviares se unen a ácidos siálicos con unión $\alpha_{2,3}$.

Las células epiteliales que recubren la tráquea humana tienen principalmente AS con enlaces $\alpha_{2,6}$, mientras que las células epiteliales del intestino de aves acuáticas, que es donde se replica el virus en estos animales, tienen principalmente AS en enlace $\alpha_{2,3}$. La afinidad por AS explica en parte la restricción de huésped de los virus de influenza.

En las células epiteliales de la tráquea de los cerdos existen ambos tipos de enlaces del AS, lo que favorece que el cerdo pueda ser naturalmente infectado, tanto por virus porcinos como por virus de origen aviar y humano, lo que resulta, como se mencionó anteriormente, que en esta especie animal se puedan generar frecuentemente rearrreglos genéticos que dan lugar a virus de influenza con combinaciones de segmentos génicos de diferentes orígenes.

Determinantes moleculares de virulencia: Proteínas virales y patogénesis

Varias de las proteínas virales juegan un papel importante en algunos de los aspectos de restricción de huésped y patogenia de los virus de influenza, incluyendo la habilidad de modular el sistema inmune del huésped y la capacidad de replicarse eficientemente a bajas temperaturas, entre otras. Las proteínas mejor caracterizadas en cuanto a su potencial patogénico son la H, PB1 y PB2. Por otro lado, las proteínas N y M2 han sido muy estudiadas, dada su capacidad de conferir resistencia a las drogas antivirales en uso.

Papel de la hemaglutinina en la virulencia y tropismo viral

Esta glicoproteína, junto con la neuraminidasa, es una de las proteínas mayoritarias de la partícula viral. Es el principal antígeno de neutralización; es decir, que la mayoría de los anticuerpos producidos en personas infectadas van dirigidos contra esta proteína y son capaces de neutralizar la infectividad del virus. La hemaglutinina, como su nombre lo indica, es capaz de aglutinar eritocitos, propiedad que ha sido utilizada para la clasificación de los diferentes serotipos de virus (17, 26). La H juega un papel muy importante durante la entrada del virus a su célula huésped. Por una parte media la unión del virus a la superficie celular, a través de su interacción con AS. Los aminoácidos de esta proteína que son responsables del reconocimiento de los diferentes enlaces de AS han sido ampliamente caracterizados.

La H se sintetiza como una proteína precursora llamada H0, que es proteolíticamente cortada en H1 y H2 en un sitio específico de la proteína. Este corte, resulta en la activación de la infectividad del virus y se ha observado que a diferencia de las cepas de baja patogenicidad, las cepas de alta patogenicidad tienen no sólo uno, sino varios aminoácidos básicos en el sitio de corte, lo que las hace particularmente susceptibles a ser activadas proteolíticamente, y por lo tanto, más infecciosas (11). El corte proteolítico es esencial para la infectividad, ya que expone un péptido hidrofóbico en el amino terminal de H2, que es responsable de mediar la fusión de las membranas viral y celular. La cepa pandémica actual tiene sólo una arginina en el sitio de corte por proteasas, al igual que las cepas de baja patogenicidad (7).

La replicación viral y la proteína PB2

Esta proteína, junto con las proteínas PB1 y PA forma el complejo de replicación del virus. Esta proteína se ha asociado con la transmisibilidad del virus, a través del aire y también con la restricción de huésped. Se ha observado que cepas que tienen ácido glutámico en la posición 627 son menos transmisibles que aquellas PB2 que tienen un residuo de lisina en la misma posición (21). También se ha reportado, que virus que tienen una lisina en la posición 627 crecen mejor en células de mamífero, que aquellos que tienen ácido glutámico. La lisina en la posición 627 le confiere al virus una eficiente replicación a 33°C, que es la temperatura de las vías aéreas superiores en humanos, mientras que a 41°C, la temperatura corporal de las aves, no se observó diferencia en la eficiencia de replicación de variantes con ácido glutámico o lisina en esta posición (9, 15). Estos datos sugieren que la transmisión eficiente de virus de influenza A, en humanos, se favorece por la selección de variantes del virus con mutaciones glutámico-lisina en el aminoácido 627 en la proteína PB2. La proteína PB2 de los virus de influenza A/H1N1/2009 reportados hasta ahora tiene ácido glutámico en la posición 627 (7, 17).

PB1-F2, un factor inductor de muerte celular

PB1-F2, es una proteína pequeña codificada por el gen que también codifica por la subunidad PB1 de la polimerasa viral. La PB1-F2 se expresa en la mayoría de las cepas de influenza A. Se ha encontrado que esta proteína interacciona las membrana de las mitocondrias, causando su permeabilización y la liberación del citocromo C, lo que induce la muerte celular (2, 27). También se ha reportado que PB1-F2 exacerba la respuesta inflamatoria durante la infección viral en ratones, y aumenta la frecuencia y la severidad de neumonías bacterianas secundarias, aunque aún se desconoce el mecanismo, a través del cual esto sucede

(16); Se ha encontrado que el gen de PB1 de las cepas pandémicas H1N1/2009 secuenciadas hasta ahora codifica por una proteína PB1-F2 truncada, la cual muy probablemente no es funcional (7, 17).

NS1 y el control de la respuesta inmune innata

Durante la replicación viral se dispara la activación de factores transcripcionales, que estimulan la producción de interferón β , ésta es una medida de la célula para prevenir las infecciones virales. La proteína NS1, es una proteína viral que antagoniza la respuesta de interferón de la célula (18, 26). El mecanismo a través del cual NS1 ejerce su función, no se ha esclarecido completamente, aunque se ha encontrado que cepas altamente virulentas, como la cepa aviar H5N1, además de conferir resistencia a los efectos antivirales del interferón, inducen una respuesta exacerbada de citocinas pro-inflamatorias (10, 14). En conjunto, estas observaciones indican que las proteínas NS1 de cepas altamente patogénicas son capaces de causar un desbalance en la producción de citocinas por parte del huésped, lo que complica el cuadro clínico del paciente. Se ha descrito que la presencia de ácido glutámico en la posición 92 de NS1 correlaciona con la alta patogenicidad de algunas cepas aviarias (19). La cepa A/H1N1/2009 presenta ácido aspártico en esa posición, que es el aminoácido que se ha encontrado en las cepas de baja patogenicidad.

M2, un canal iónico viral

La proteína M2 es la menos abundante de la cubierta viral. Esta proteína funciona como canal iónico, que permite la entrada de protones al interior de la partícula viral facilitando la liberación del genoma del virus y sus proteínas asociadas, para que éste sea importado al núcleo e inicie su replicación. M2 es el principal blanco de las drogas antivirales conocidas como adamantanos, cuya actividad es la de bloquear selectivamente el canal formado por M2, lo que inhibe la liberación, y por lo tanto la replicación del genoma viral (25). Estos compuestos han sido el tratamiento de elección contra brotes de influenza por muchos años; sin embargo, se ha encontrado que la resistencia a los adamantanos aparece rápida y frecuentemente en cepas silvestres del virus de la influenza. La mayoría de las cepas H1N1 y H3N2 estacionales humanas y porcinas que circulan actualmente son resistentes a estos antivirales. La nueva cepa A/H1N1/2009 no es la excepción, ya que hasta ahora todos los virus analizados han resultado ser resistentes a estas drogas (7).

La neuraminidasa y la diseminación viral

Esta glicoproteína es una sialidasa, cuya función es la de remover los AS de las glicoproteínas virales de los virus recién sintetizados, así como los AS presentes en la superficie celular, lo que permite la eficiente liberación del virus de la célula infectada, para así poder infectar nuevas células (18, 26). La inhibición de la actividad de esta proteína provoca que los virus producidos en una célula se mantengan unidos a la superficie de la célula y agregados entre sí, lo que inhibe su diseminación (18, 26).

La N es el blanco de los antivirales oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza). Estas moléculas son inhibidores específicos de la actividad de sialidasa o neuraminidasa de la proteína. Recientemente, se han descrito cepas de influenza estacional H1N1, cuya actividad de neuraminidasa es resistente a oseltamivir. La mutación más frecuente que confiere la resistencia de la N a esta droga es la sustitución de una histidina por una tirosina, en la posición 275 (3).

Al 5 de marzo de 2010 se han reportado 264 aislados; de más de 10,000 probados, de cepas del virus pandémico A/H1N1/2009 que son resistentes a oseltamivir. Estos virus han sido aislados en diferentes

partes del mundo, incluyendo un aislado reciente en México, y todos llevan la mutación de histidina por tirosina en la posición 275, la cual confiere resistencia a oseltamivir, pero no a zanamivir. Los virus mutantes resistentes a oseltamivir no parecen transmitirse eficientemente de persona a persona, por lo que los casos de aislamiento de virus resistentes a éste fármaco han sido esporádicos y no se han transmitido a contactos cercanos (<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/oseltamivirresistant20100305.pdf>).

Vacunas

Por el momento, la acción más importante para el control de la influenza es la vacunación. En adultos sanos la vacuna contra los virus de influenza estacional ha demostrado ser muy efectiva, reduciendo la enfermedad en el 70-90% de los individuos vacunados, cuando éstos entran en contacto con un virus igual o antigénicamente relacionado con los virus contenidos en la vacuna. En los adultos mayores la vacunación puede reducir la mortalidad entre 39 y 75%. Las ventajas de la vacunación se extienden más allá del individuo vacunado, ya que limita la dispersión del virus en la población (26). Debido a la alta variabilidad antigénica del virus, la mejor manera de estar protegidos contra la influenza es vacunarse cada año con la vacuna que se prepara anualmente. En el caso de la cepa pandémica A/H1N1/2009, los datos reportados hasta ahora indican que la vacuna dirigida contra los virus estacionales no confiere protección (8).

Las vacunas estacionales contra influenza son trivalentes, esto es, protegen contra las tres principales cepas circulantes del virus: influenza A, subtipos H1N1 y H3N2, e influenza B. Cada año la OMS recomienda las cepas de virus que deben de incluirse en la vacuna estacional. Estos virus son escogidos de entre las cepas virales que circulan hacia el final de la primavera, ya que usualmente son éstos los que causarán la epidemia el invierno siguiente.

La vacuna contra influenza se utiliza desde 1945, cuando fue desarrollada por el ejército de los Estados Unidos para proteger a sus soldados contra la enfermedad en la segunda guerra mundial. La tecnología que se empleó inicialmente no ha cambiado sustancialmente, y consiste en el uso de embriones de pollo para el crecimiento de las cepas de virus vacunales. Debido a las dificultades asociadas a la producción de vacunas en embriones de pollo, que incluyen el tiempo de producción, seis meses, la limitación en el número de huevos fertilizados disponibles para responder ante una emergencia y la posibilidad de que la cepa pandémica pudiera ser letal para los embriones de pollo, entre otras, hay proyectos con diferentes grados de avance para producir las vacunas, a partir de virus crecidos en células en cultivo.

Igualmente, hay esfuerzos importantes para generar vacunas utilizando métodos de DNA recombinante, tales como de vacunas de DNA o vacunas basadas en el uso de las proteínas H y N individuales sintetizadas en células de insecto utilizando baculovirus como vector, entre otras (4, 12). En particular, este último enfoque parece prometedor, por los resultados de pruebas clínicas fase III que han demostrado su eficacia, y por la rapidez con que se podría responder con nuevas vacunas ante la aparición de una cepa epidémica (13).

Aunque, la severidad de la infección causada por la cepa pandémica A/H1N1/2009 ha resultado similar a la de las cepas del virus de influenza que circulan estacionalmente, el nuevo virus se ha distribuido rápidamente por el mundo resultando en la primera pandemia del siglo XXI. Esto ha ocurrido debido a la falta de inmunidad de la población, ante la aparición de un virus en humanos cuyas proteínas de superficie, H y N, son antigénicamente diferentes a las presentes en los virus estacionales. La vacuna contra la cepa A/H1N1/2009 que recientemente se puso a disposición de la población en nuestro país ha demostrado, después de ser aplicada a millones de personas en todo el mundo, ser igual de segura que la vacuna contra los virus de influenza estacionales que se ha venido aplicando desde hace muchos años y por lo pronto, representa la mejor medida que podemos tomar y recomendar para protegernos la 10 - xx

enfermedad causada por este virus.

Como universitarios y profesionistas es nuestro deber estar informados lo mejor posible y orientar a las personas de nuestro entorno acerca de las mejores medidas que se pueden tomar en situaciones como a la que nos expuso la presente pandemia. En esta época de tecnología de la información es muy importante; estar muy atentos y juzgar con criterio la información a la que accedemos via internet. Les recomendamos la página de la Organización Mundial de la Salud, como una fuente fidedigna para basar su opinión acerca de éste y otros temas de salud:

(http://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/vaccine_preparedness/safety_approval/en/index.html)

Bibliografía

1. Bouvier, N. M., and P. Palese. 2008. "The biology of influenza viruses". *Vaccine* 26 Suppl 4:D49-53.
2. Chen, W., P. A. Calvo, et al. 2001. "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death" *Nat Med* 7:1306-12.
3. Colman, P. M. 2009. "New antivirals and drug resistance" *Annu Rev Biochem* 78:95-118.
4. Cox, M. M., P. A. Patriarca, and J. Treanor. 2008. "FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine" *Influenza Other Respiratory Viruses* 2:211-9.
5. Drake, J. W. 1993. "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses" *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4171-5.
6. Fraser, C., C. A. Donnelly, et al. 2009. "Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings" *Science* 324:1557-61.
7. Garten, R. J., C. T. Davis, et al. 2009. "Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans" *Science* 325:197-201.
8. Hancock, K., V. Veguilla, et al. 2009. "Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus" *N Engl J Med*.
9. Hatta, M., Y. Hatta, et al. 2007. "Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice" *PLoS Pathog* 3:1374-9.
10. Jiao, P., G. Tian, et al. 2008. "A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice" *J Virol* 82:1146-54.
11. Kawaoka, Y., and R. G. Webster. 1988. "Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells" *Proc Natl Acad Sci U S A* 85.

12. Kim, J. H., and J. Jacob. 2009. "DNA vaccines against influenza viruses" *Curr Top Microbiol Immunol* 333:197-210.
13. King, J. C., Jr., M. M. Cox, K. Reisinger, J. Hedrick, I. Graham, and P. Patriarca. 2009. "Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok((R)) trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy children aged 6-59 months" *Vaccine*.
14. Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao, *et al.* 2006. "The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses" *J Virol* 80:11115-23.
15. Massin, P., S. van der Werf, and N. Naffakh. 2001. "Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses" *J Virol* 75:5398-404.
16. McAuley, J. L., F. Hornung, K. L. Boyd, A. M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J. W. Yewdell, and J. A. McCullers. 2007. "Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia" *Cell Host Microbe* 2:240-9.
17. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka. 2009. "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus" *Nature* 459:931-9.
18. Palese, P., and M. Shaw. 2006. "Orthomyxoviridae: The viruses and their replication" p. 1647-1689. In D. Knipe and P. Howley (ed.), *Fields Virology*, Fifth Edition ed, vol. II. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
19. Seo, S. H., E. Hoffmann, and R. G. Webster. 2002. "Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses" *Nat Med* 8:950-4.
20. Smith, G. J., J. Bahl, *et al.* 2009. "Dating the emergence of pandemic influenza viruses" *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11709-12.
21. Steel, J., A. C. Lowen, S. Mubareka, and P. Palese. 2009. "Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N" *PLoS Pathog* 5:e1000252.
22. Strauss, J., and E. Strauss. 2008. *Minus-strand RNA viruses, 5 Viruses and human disease*, Second ed, vol. 4. Elsevier, Oxford, UK, p. 137-17
23. Taubenberger, J. K., A. H. Reid, R. M. Lourens, R. Wang, G. Jin, and T. G. Fanning. 2005. "Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes" *Nature* 437:889-93.
24. Trifonov, V., H. Khiabani, and R. Rabadan. 2009. "Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus" *N Engl J Med* 361:115-9.
25. Varghese, J. N., W. G. Laver, and P. M. Colman. 1983. "Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution" *Nature* 303:35-40.
26. Wright, P., G. Neumann, and Y. Kawaoka. 2006. "Orthomyxoviruses" *Fields Virology*, Fifth Edition ed, vol. II. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1691-1740.
27. Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang, and P. Palese. 2005. "Influenza virus PB1-F2 protein

induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1" PLoS Pathog 1:e4.

