

Estudio prospectivo sobre los patrones genéticos y correlaciones filogenéticas de las cepas gripales aisladas en las Islas Baleares

Jordi Reina

Unidad de Virología
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca

Resumen

La importancia del conocimiento de las características genéticas y antigénicas de las cepas gripales que afectan a una determinada comunidad en una determinada temporada gripal, es la base sobre la que se ha realizado este estudio sobre cepas aisladas en la temporada 2006-2007. Los procesos de aislamiento, tipificación, amplificación y secuenciación genética se han realizado por métodos automatizados. Los datos se analizaron mediante el programa Clustal W y los árboles filogenéticos se realizaron mediante la técnica de neighbor-joining y bootstrap. De las 20 cepas estudiadas, 2 eran influenza A (H1N1), 14 influenza A (H3N2) y 4 influenza B. Las cepas H1N1 fueron identificadas genéticamente como pertenecientes al linaje 1 (A/New Caledonian/20/99-like) vacunal. Aunque la mayoría de cepas aisladas en el resto del país pertenecían al linaje 2 (A/Solomon Islands/3/06-like). En las cepas H3N2 se han obtenido 2 agrupaciones genéticas distintas. El más numeroso (57%) estaba genéticamente alejado de la cepa vacunal (A/Wisconsin/67/05), mostrando el inicio del cambio antigénico estacional. De las cepas gripales tipo B, se obtuvo una cepa semejante a la cepa vacunal (linaje Victoria) y el resto eran filogenéticamente semejantes al linaje Yamagata. Se detectó una falta de concordancia antigénica y genética con la cepa B vacunal de la temporada. Estos estudios permiten conocer las características antigénicas de las cepas co-circulantes y tomar las decisiones adecuadas si se observara un deslizamiento antigénico mayor que obligara a realizar una nueva recomposición vacunal y a la necesidad de una dosis vacunal de refuerzo para compensar la menor concordancia observada.

Palabras clave: Gripe A y B; Genética; Filogenética; Epidemiología

Abstract

The aim of this study is to analyze the genetic and antigenic characteristics of influenza virus strains isolated in our regional zone in the 2006-2007 epidemical season. Automatized methods were used for the processes of isolation, typing, amplification and genetic sequence analysis of viral strains. The results were analyzed by the Clustal W informatic program and the phylogenetic trees were developed by the methods of neighbor-joining and bootstrap. We studied 20 viral strains, 2 influenza A (H1N1), 14 influenza A (H3N2) and 4 influenza B. The H1N1 strains were genetically identified as belonging to the vaccine clade 1 (A/New Caledonian/20/99-like). In the rest of Spain the predominance was influenza strains belonging to clade 2 (A/Solomon Islands/3/06-like). In the H3N2 influenza strains we detected 2 genetical clusters. The predominant (57%) was not genetically related to vaccine strain (A/Wisconsin/67/05), starting the seasonal antigenic drift. Of influenza B strains, we detected one strain related to the vaccine strain (Victoria clade) and the others were phylogenetically related to the Yamagata clade. We detected an antigenic and genetic mismatch between the isolated B strains and the vaccine strain. These genetic studies are very important to know and evaluated the strains that co-circulate in every influenza season. The detection of an important mismatch (antigenic drift) could determine the modification of the influenza vaccine composition and the need to re-vaccinate all the population with an additional dosis.

Keywords: Influenza A and B; Genetic analysis; Phylogenetic analysis; Epidemiology

Introducción

La gripe es una enfermedad vírica causada preferentemente por los virus gripales A y B (virus influenza A y B) que se presenta anualmente como brotes epidémicos con una duración media 6-8 semanas. La gripe es una enfermedad considerada como benigna

pero con un alto índice de morbilidad, especialmente en las edades extremas de la vida^{1,2}. Las cepas gripales humanas del tipo A presentan un genoma RNA monofilar segmentado¹⁻⁴. Desde el punto de vista genético las cepas gripales presentan una serie de mutaciones puntuales, inducidas por la presión selectiva del sistema inmunológico, que determinan

pequeños cambios antigénicos designados como deriva antigénica (origen de las epidemias de gripe). Este fenómeno es en parte el responsable de la necesidad anual de actualizar las vacunas en cada temporada. Además de ello, estos virus son capaces de intercambiar segmentos genómicos con otros virus de diferentes especies animales, en un proceso designado como reasortamiento, dando lugar a un cambio antigénico profundo y a la aparición de una cepa con un subtipo nuevo frente al cual la población humana generalmente carece de memoria inmunológica (origen de las pandemias de gripe)^{3,5-7}.

La evolución de los virus gripales, preferentemente el virus gripal A en la especie humana, es muy parecida a los otros virus RNA y se caracteriza básicamente por (a) los diferentes genes evolucionan con una tasa mucho más elevada que los virus DNA, calculándose un error por cada 10.000 nucleótidos; (b) la tasa de recambio o sustitución de los diferentes aminoácidos difiere en cada uno de los genes, pero la tasa de sustituciones silentes es muy similar entre ellos; (c) los genes gripales considerados de forma individual acumulan unas tasas casi constantes de mutación a lo largo de los períodos evolutivos⁶⁻⁸. Los diferentes estudios realizados hasta ahora parecían indicar la existencia de un proceso evolutivo extremadamente rápido del virus gripal A, especialmente en el gen de la hemaglutinina (H), lo cual podría ser debido a un proceso de selección positiva continua.

La importancia del conocimiento de las características genética y antigénicas de las cepas gripales que afectan a una determinada comunidad en una determinada temporada gripal, es la base sobre la que se ha realizado este estudio sobre cepas aisladas en pacientes pediátricos en la temporada 2006-2007.

Material y Métodos

Se ha realizado un estudio prospectivo durante el período gripal epidémico 2006-2007 (octubre-mayo) sobre las características antigénicas, genéticas y filogenéticas de las cepas gripales A y B aisladas en los pacientes pediátricos con una infección respiratoria aguda. A todos ellos se les tomó un aspirado nasofaríngeo. A todas las muestras se les realizó inicialmente la prueba de la detección antigénica rápida frente al virus respiratorio sincitial (VRS) mediante un ensayo inmunoenzimático comercial en fase sólida (dot-blot) (Directigen RSV, Becton & Dickinson, USA) y frente a los virus gripales A y B (Directigen FluA+B,

Becton & Dickinson, USA) siguiendo en ambos casos todas las recomendaciones del fabricante.

Las muestras que fueron negativas frente al VRS fueron sembradas en dos shell vials de la línea celular MDCK (Vircell, Granada). La técnica de inoculación utilizada ha sido la del cultivo postcentrifugación (3500 rpm/10 minutos). Los viales fueron mantenidos a 36°C durante 30 minutos para favorecer el proceso de adsorción viral a la monocapa y posteriormente se les añadió el medio de mantenimiento. El medio base utilizada fue el MEM con adición de tripsina (2 µg/ml) para las líneas destinadas al aislamiento de los virus gripales A y B y el virus de la parainfluenza. Los viales fueron incubados a 36°C durante 3 días. Los diferentes viales fueron teñidos con anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los diferentes virus respiratorios mediante una inmunofluorescencia indirecta (Monofluokit, BioRad, Irlanda). En el caso de los virus gripales se utilizaron monoclonales diferenciales dirigidos contra la proteína de matriz (M1A y M1B) (Monofluokit FluA+B, BioRad, Irlanda). Se consideraron como positivas aquellas muestras que presentaron una fluorescencia específica de localización citoplasmática compatible con el efecto viral de cada uno de ellos.

Para el proceso del subtipado H1 y H3, las cepas fueron inoculadas en tres viales de la línea celular MDCK e incubados durante 3 días a 36°C. Uno de los viales fueron revelados con los anticuerpos monoclonales comerciales específicos anti-H1 y anti-H3 (Chemicon, Palex, Barcelona) mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Para el proceso de extracción del RNA viral se han utilizado 200 µl de cada una de las muestras respiratorias. Se ha utilizado el sistema automatizado de extracción EZ1 virus minikit v2.0 (BioRobot EZ1; Qiagen, UK). El proceso de amplificación genómica del RNA viral extraído se ha realizado mediante una técnica de retrotranscriptasa-PCR (RT-PCR) utilizando el sistema comercial automatizado en tiempo real OneStep RT-PCR FluA+FluB (Qiagen, UK) con el sistema de amplificación SmartCycler (Izasa, Barcelona). La amplificación específica de los genes de la hemaglutinina para cada uno de los virus gripales (AH1, AH2 e IB-H) se realizó a partir del material procedente del proceso de extracción (5 µl) junto a la mezcla de amplificación y detección. Los primers para el virus HA1 (subtipo H1), virus AH3 (subtipo H3) y virus influenza B (IB-H) fueron los recomendados por Smith et al.⁹ con pequeñas modificacio-

nes adaptativas al sistema de amplificación SmartCycler. Los productos amplificados de los genes de la hemaglutinina (H) fueron purificados con una columna MicroSpin S-300 HR-PCR kit (Amersham Bioscience, UK), marcados mediante el empleo de BigDye terminator cycle sequencing kit (version 3.1) (Applied Biosystems, CA) siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron posteriormente analizadas con el secuenciador automático ABI 3100. Las secuencias fueron ensambladas mediante el empleo del programa MEGA (version 3.1) descrito por Li et al.¹⁰. Los alineamientos de las secuencias múltiples se analizaron mediante el programa Clustal W para los segmentos procedentes de las tres zonas codificadoras: HA1 (938 bp), HA3 (923 bp) y IB-H (894 bp).

Los árboles filogenéticos se elaboraron utilizando el sistema de análisis designado como neighbor-joining and bootstrap¹¹. Se definieron como grupos filogenéticos distintos aquellas ramas con valores de bootstrap superior al 70%. Se utilizaron como controles las cepas vacunales A y B utilizadas en las últimas temporadas gripales.

Los linajes del subtipo H1N1 se establecieron en función de la presencia de la mutación Y252F (sustitución de tirosina por fenilalanina en la posición 252) en el gen HA1 (linaje o clade 1) o de la presencia de la mutación K104E (sustitución de lisina por ácido glutámico en la posición 104) en el gen HA1 (linaje o clade 2)^{11,12}.

Resultados

Durante la temporada epidémica 2006-2007 se han diagnosticado 103 casos de infección gripal. De todos ellos 72 (70%) correspondían a pacientes pediátricos (menores de 14 años).

Las cepas fueron identificadas a nivel de tipo como 63 virus influenza A (gripe tipo A) (87%) y 9 como virus influenza B (13%) (p<0.05). De las cepas identificadas como influenza A, 61 (96.8%) pertenecían al subtipo (H3N2) y 2 (3.2%) al subtipo (H1N1) (p<0.05). De las cepas tipadas sólo se les realizó el estudio genético y filogenético en 20 de ellas (27.7%), siguiendo las recomendaciones internacionales sobre caracterización final de los aislamientos gripales. Las cepas fueron seleccionadas con los siguientes criterios: primeros aislamientos (comprobación de concordancia antigénica vacunal), cepas de

pacientes inmunodeprimidos y cepas del final de la temporada epidémica (adelanto de las posibles derivas antigénicas de la próxima temporada).

Las dos cepas gripales inicialmente caracterizadas como tipo A (H1N1)(100% de las aisladas) fueron confirmadas definitivamente como pertenecientes al linaje/clade 1, perteneciente al tronco genético de la cepa vacunal A/New Caledonia/20/99 (Figura 1). Filogenéticamente se agruparon en un cluster común de la temporada junto a las cepas aisladas preferentemente en las comunidades del sur y arco mediterráneo. La divergencia genética entre ellas permitía subclasificarlas en clusters subtípales; aunque las dos cepas estudiadas por nosotros eran prácticamente indistinguibles genéticamente entre si, a pesar de haberse aislado en pacientes procedentes de localizaciones geográficas distintas.

En la Figura 1 se observa como casi el 50% de las cepas gripales A (H1N1) estudiadas ya pertenecían genética y filogenéticamente al linaje/clade 2 y eran muy similares a la cepa A/Solomon Islands/3/2006, que circulaba endémicamente en el hemisferio sur.

De las 61 cepas gripales identificadas inicialmente como tipo A (H3N2), se realizó el estudio genético en 14 de ellas (22.9%).

Como puede observarse en la Figura 2 se han obtenido dos agrupaciones o clusters genética y filogenéticamente bastante divergentes. El primero de ellos y mas numeroso (8 cepas, 57%) estaban bastante alejadas genéticamente de la cepa vacunal de la temporada (A/Wisconsin/67/05), a pesar de lo cual fueron caracterizadas definitivamente como cepas Wisconsin-like.

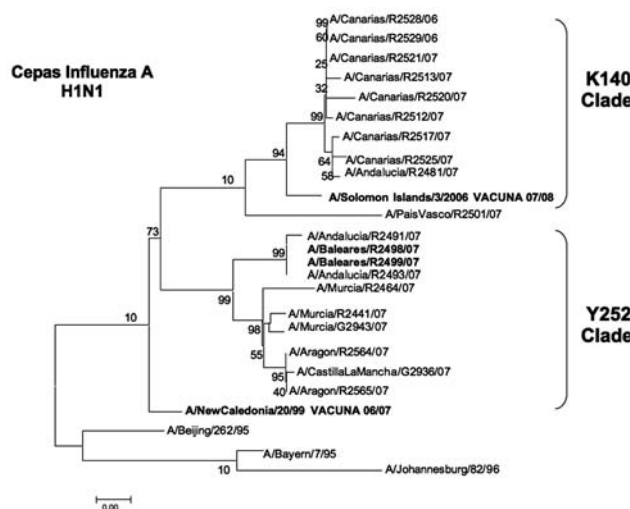


Figura 1

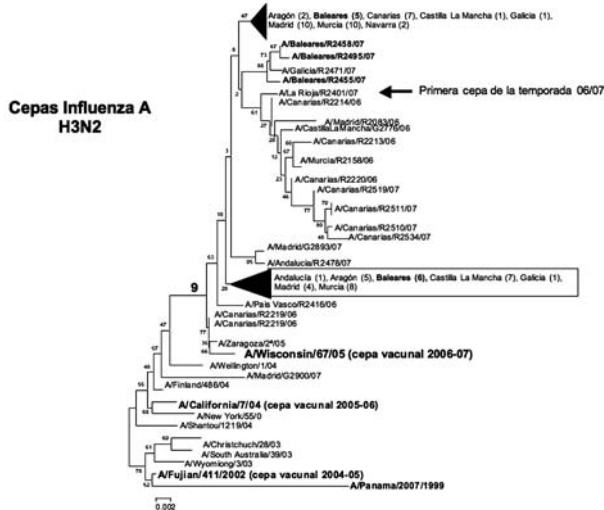


Figura 2

Dentro de este mismo grupo genético estaban también incluidas cepas gripales de la mayoría de comunidades autónomas, lo cual hace pensar en una distribución y difusión universal de la misma.

El segundo agrupamiento de cepas (H3N2) estaba mucho más cerca, filogenéticamente, de la cepa vacunal, y su grado de divergencia nucleotídica era mucho menor. Estas cepas, también identificadas en la mayoría del territorio nacional, fueron las aisladas preferentemente al inicio y en el pico de la máxima actividad gripal de la temporada. Por el contrario el agrupamiento divergente estaba formado por cepas aisladas al final de la temporada y podrían reflejar el inicio de un deslizamiento antigénico hacia otra variante predominante.

En cuanto a las 9 cepas gripales tipo B, 4 de ellas (44.4%) fueron estudiadas genética y filogenéticamente. Sólo una de las cepas estudiadas (25%) era genéticamente similar a la cepa vacunal de esta temporada, B/Malaysia/2506/04 (linaje Victoria) (Figura 3). Las otras 3 cepas (75%) analizadas estaban muy alejadas genéticamente de la cepa vacunal y eran mucho más semejantes a las cepas pertenecientes al linaje Yamagata; por lo tanto se detectó una falta de concordancia entre las cepas gripales B circulantes y la incluida en la vacuna.

Discusión

Las cepas gripales A (H1N1) fueron las responsables originalmente de la pandemia ocurrido en 1918-1919 (la gripe española) que ocasionaron la muerte de cerca de 20 millones de personas; estas cepas fueron sustituidas por la cepa H2N2 en 1957 y éstas a su

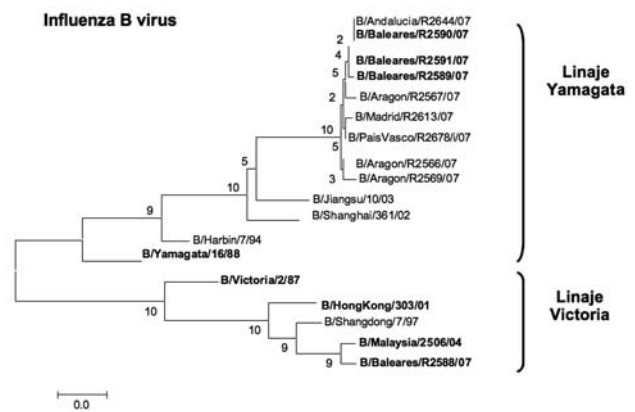


Figura 3

vez por la H3N2 en 1968. Sin embargo la cepa H1N1 reapareció en 1977 (gripe rusa) y a partir de ese momento co-circula con la cepa gripal A (H3N2) en cada temporada gripal³⁻⁶. Las tasas de acumulación de mutaciones en los genes N y H del subtipo H1N1 son comparables a las observadas en el subtipo H3N2; sin embargo los cambios antigénicamente significativos aparecen con una frecuencia muy baja, de modo que los cambios vacunales son poco habituales¹².

En comparación con la cepa vacunal de la temporada 2005-2006 (A/New Caledonia/20/99) las cepas aisladas en nuestro país, incluidas las dos de Baleares, coincidían antigénicamente con la cepa de referencia (linaje 1)¹³. Las cepas aisladas y caracterizadas en nuestro país en esta temporada eran antigénica y filogenéticamente muy parecidas a la cepa vacunal. Filogenéticamente se las podía agrupar en un cluster común de la temporada gripal junto a las cepas aisladas preferentemente en las áreas geográficas pertenecientes al sur y a la cuenca mediterránea, zonas de las que probablemente procedan las cepas gripales de nuestra comunidad autónoma. La divergencia genética entre todas ellas permitía subclasificarlas en clusters subtípales; aunque las dos cepas estudiadas por nosotros eran prácticamente indistinguibles genéticamente entre sí. Tal y como se puede observar en la Figura 1 casi el 50% de las cepas gripales A (H1N1) aisladas en esta temporada presentaban una suficiente divergencia genética para poder intuir su futura pertenencia al linaje/clade 2. La elevada prevalencia de esta cepa en la temporada epidémica determinó que la OMS incluyera esta cepa en la vacuna antigripal para la temporada siguiente (2007-2008)⁹¹⁴.

La cepa gripal A (H3N2) ha mostrado desde su introducción en la especie humana en 1968, un proceso de evolución y divergencia genética en sus glicoproteínas H y N que ha determinado la aparición continuada de variantes antigénicas (genéticas) que se han ido distanciando del tronco genético principal que caracteriza a esta cepa^{15,16}. Durante los últimos 5 años (2001-2006) las cepas gripales A (H3N2) han evolucionado a partir de una cepa intermedia entre la A/Panama/2007/99 y la A/Fujian/411/02 deslizando antigénicamente hacia la nueva cepa A/Wisconsin/67/05 incluida en la vacuna de la temporada 2006-2007¹⁷. Los genes de la hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) evolucionan de forma independientes siguiendo líneas genéticas secuenciales pero no lineales, mientras que los genes estructurales como el de matriz (M) presentan un proceso evolutivo no lineal e independiente de los genes anteriores¹⁸. El gen H evoluciona mucho más rápidamente, número de nucleótidos sustituidos por temporada, que los genes N y M, de forma que en la cepa A (H3N2) los cambios son sincrónicos entre los diferentes genes^{18,19}.

Los genes H (fragmento H1) de las cepas gripales aisladas en la temporada 2006-2007 se diferenciaban claramente de las cepas vacunales incluidas en las últimas temporadas (A/Panama y A/Fujian), desplazándose hacia la cepa americana A/Wisconsin aislada en 2005²⁰. Los estudios filogenéticos realizados en este gen han demostrado que la mayoría de las cepas aisladas en España en la temporada 2006-2007 eran muy similares a la cepa vacunal (A/Wisconsin/67/05) presentando los cinco cambios en los aminoácidos descritos como caracterizadores de la cepa vacunal.

En el estudio filogenético de las 14 cepas pertenecientes al subtipo H3N2 se ha observado la existencia de dos agrupaciones o clusters genéticos divergentes. El primero de ellos, que ha representado el 57% de las cepas está suficientemente alejado de la cepa vacunal de la temporada en curso (A/Wisconsin/67/05). A pesar de ello el grado de divergencia ha permitido clasificarlas y asignarlas a esta cepa vacunal, de modo que los estudios de respuesta inmunológica en los vacunados han dado tasas de protección por encima del 80%^{13,18}.

El segundo agrupamiento corresponde al conjunto de cepas predominante en toda la península y están genéticamente muy cercanas a la cepa vacunal. Estos resultados son similares a la mayoría de temporadas en las que el 70-80% de las cepas circulantes se sitúan a poca distancia genética (deslizamiento menor) de la

cepa vacunal de la temporada en curso. Todas estas cepas correspondían al inicio y parte central de la temporada gripal, de modo que a medida que avanza la misma se observa un mayor deslizamiento antigénico, que en nuestro estudio correspondería a las cepas del cluster anteriormente analizado. La presión inmunológica selectiva realizada por el sistema inmune de la población general vacunada determina variaciones menores de las cepas a lo largo de la temporada que se detectan en las cepas aisladas al final de la misma. Este hecho es la base que establece la necesidad del aislamiento y caracterización genética y antigénica de las cepas aisladas al principio y final de cada nueva temporada gripal²¹.

La evolución de las cepas gripales tipo B es un proceso completamente distinto, ya que se produce una co-circulación de variedades genéticas y antigénicas que proceden de dos linajes antiguos derivados de un ancestro común^{12,15}. De este modo los dos linajes actualmente existentes, con relaciones filogenéticas comunes en sus genes H, derivan de una cepa predominante en los años 70, que dio lugar al linaje Victoria (B/Victoria/287) y al linaje Yamagata (B/Yamagata/16/88). Desde el punto de vista epidemiológico debe distinguirse de forma clara entre los linajes con tiempo de extinción corto (<6 meses de circulación poblacional) y los de tiempo de extinción largo (>6 meses). Así se ha postulado que los nuevos linajes que van apareciendo y que presentan una mayor y especial ventaja adaptativa (fitness), determinan más fácilmente la extinción de los linajes cocirculantes más viejos, siendo esta capacidad más eficaz que los nuevos linajes que presentan un escaso o nulo fitness (ventajas mínimas o sin ellas).

Las cepas pertenecientes a estos dos linajes han predominado en diferentes períodos, sustituyéndose uno a otro en temporadas consecutivas o alternas. Inicialmente el linaje Victoria predominaba casi exclusivamente en Asia, mientras que el linaje Yamagata predominaba en Europa, África y América¹⁷. Sin embargo en los últimos años ambos linajes se han expandido por todos los continentes, y cuando predomina uno de ellos, lo hace a nivel mundial²¹. Estudios recientes han demostrado que en una misma temporada gripal, un linaje puede predominar en el hemisferio norte y el otro en el hemisferio sur, siendo difícil prever con suficiente antelación los cambios y sustituciones entre ellos. De ahí que en algunas temporadas gripales, como la que hemos estudiado, se hayan podido detectar ambos linajes, no estando los dos incluidos en la vacuna^{13,17}.

Tal y como se ha mencionado, en el estudio realizado sobre las cepas gripales tipo B de esta temporada, sólo una de ellas (25%) era genética y antigénicamente similar a la cepa vacunal (B/Malaysia/2506/04)(linaje Victoria). El resto de las cepas (75%) estaban lo suficientemente alejadas de la misma y fueron incluidas en un cluster con semejanza genética con la cepa patrón del linaje Yamagata. Como consecuencia de ello se pudo comprobar una falta de concordancia entre las cepas B circulantes y la cepa vacunal, aunque no se obtuvieron tasas de prevalencia superiores a las esperadas.

El análisis y la caracterización genética y antigénica de las cepas gripales A y B que circulan en una determinada temporada gripal, es un dato imprescindible para el conocimiento de la biología y ecología gripal. La designación, en febrero, de las cepas gripales que va a contener la vacuna antigripal que se administrará en octubre de este mismo año, representa un problema logístico y de probabilidad evolutiva²¹. Las cepas gripales están en un continuo cambio y selección antigénica que hace muchas veces impredecible su comportamiento al inicio y final de una temporada gripal. Estudios parecidos a los realizados por nosotros permiten conocer en tiempo real, durante se está produciendo la epidemia gripal, las características antigénicas de las cepas co-circulantes y tomar las decisiones adecuadas si se observara una desviación o deslizamiento antigénico mayor que obligara a realizar una nueva recomposición vacunal y a la necesidad de una dosis vacunal de refuerzo para compensar la menor concordancia observada.

Bibliografía

- Hayden FG, Palese P. Influenza virus. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds.). *Clinical virology*. Churchill Livingstone Inc, New York, 1997, p.911-942.
- Ito T, Kawaoka Y. Avian influenza. En: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds.). *Textbook of influenza*. Blackwell Science, Oxford, 1998, p.126-136.
- Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields virology* (4th). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, p.1533-1579.
- Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields virology* (4th). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, p.1487-1532.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56:152-179.
- Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. The evolution of human influenza viruses. *Phil Trans R Soc Lond* 2001; 356:1861-1870.
- Bush R, Bender M, Subbarao CA, Cox NJ, Fitch W. Predicting the evolution of human influenza A. *Science* 1999; 286:1921-1925.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Res* 1992; 56:152-179.
- Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus A, Fouchier RA. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza viruses. *Science* 2004; 305:371-376.
- Li D, Saito R, Le MT, Nguyen HL, Suzuki Y, Shobugawa Y et al. Genetic analysis of influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses circulating in Vietnam from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46:399-405.
- McCullers J, Wang A, He GC, Webster RG. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J Virol* 1999; 73:7343-7348.
- Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota J, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* 1990; 175:59-68.
- Mumford JA. Vaccines and viral antigenic diversity. *Rev Sci Tech* 2007; 26:69-90.
- Young JF, Palese P. Evolution of human influenza A viruses in nature. Recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains. *PNAS* 1979; 76:6547-6551.
- Yamashita M, Krystal M, Fitch WM, Palese P. Influenza B virus evolution: cocirculating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* 1988; 163:112-122.
- Holmes E, Ghedin E, Miller N, Taylor J, Bao Y, George S et al. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biol* 2005; 3:1579-1588.
- WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006-2007 influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2006; 81(9):82-86.

18. Cox N, Black R, Kendal AP. Pathways of evolution of influenza A (H1N1) viruses from 1977 to 1986 as determined by oligonucleotide mapping and sequencing studies. *J Gen Virol* 1989; 70:299-313.
19. Hayashida H, Toh H, Kikuno R, Mayata T. Evolution of influenza virus genes. *Mol Biol Evol* 1985; 2:289-303.
20. Mar A, Rahmanian R, Lei V, Lawrence D, Kraiden M, Brunchman RC et al. Longitudinal analysis of genotype distribution of influenza A virus from 2003 to 2005. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3583-3588.
21. Gillim-Ross L, Subbarao K. Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *CLIN Microbiol Rev* 2006; 19:614-636.

