ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

Caracterização genética da nova variante pandémica do vírus influenza A(H1N1) 2009 em circulação em Portugal: resultados preliminares

Genetic characterization of the new pandemic influenza virus A(H1N1) 2009 variant in Portugal: preliminary results

/ L. A. Santos[1] / V. Correia[1]
/ S. Pedro[2] / E. Alverca[3] / M. M. Santos[4]
/ M. J. Silvestre[4] / H. Rebelo-de-Andrade[1, 5]

[1] Laboratório Nacional de Referência de Resistência aos Antimicrobianos e Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
[2] Unidade de Tecnologia e Inovação, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
[3] Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia, Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
[4] Serviço de Patologia Clínica, Virologia/Biologia Molecular, Hospital de Curry Cabral
[5] SCPM-URIA, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Patrocínios:

Trabalho desenvolvido no âmbito dos projectos financiados pela Fundação Calouste Gulbenkian *Vigilância e monitorização da susceptibilidade aos antivirais específicos para a gripe e Avaliação e caracterização da emergência das resistências aos antivirais específicos para a gripe no contexto da infecção respiratória aguda*, o primeiro submetido e aprovado pela comissão de ética e o segundo submetido para aprovação.

Correspondência:

Professora Doutora Helena Rebelo-de-Andrade
Laboratório Nacional de Referência de Resistência aos Antimicrobianos e Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz
1649-016 Lisboa
Portugal

Telefone: +351 217508159
e-mails: h.rebelo.andrade@insa.min-saude.pt
hlnrebelodeandrade@gmail.com

/ Resumo

Introdução: Os vírus influenza são caracterizados por uma contínua variação antigénica e, consequentemente, por uma rápida evolução molecular. Esta evolução é consequência de mutações e/ou rearranjo dos segmentos no genoma viral e contribui para a emergência de novas estirpes com diferente patogenicidade, virulência e perfil antivírico.
Objectivos: Descrever a morfologia e caracterizar o perfil genético de vírus influenza da nova variante A(H1N1) circulantes no nosso país.
Métodos: Estirpes da nova variante do vírus influenza A(H1N1) foram caracterizadas morfologicamente por microscopia electrónica de transmissão, e geneticamente por sequenciação, análise de mutações e análise filogenética.
Resultados: Foram detectadas as mutações P100S, S220T e I338V na hemaglutinina, as mutações V106I e N248D na neuraminidase e duas mutações sinónimas no gene da matriz, comparativamente com a sequência da estirpe vacinal A/California/07/2009.
Discussão: As mutações identificadas classificam as estirpes no cluster 2 definido por Fereidouni *et. al.*, 2009 (estirpe vacinal incluída no cluster 1). No gene da hemaglutinina, foram identificadas mutações em sítios antigénicos, num local de ligação aos receptores celulares, e uma mutação provavelmente associada a um novo local de N-glicosilação. As estirpes apresentam um perfil antivírico resistente aos inibidores da proteína M2. O perfil para os inibidores da neuraminidase só poderá ser determinado em associação com a informação dos estudos fenotípicos em curso no nosso grupo de investigação.

Palavras-chave: Vírus influenza A(H1N1)v, caracterização genética, pandemia de gripe

/ Abstract

Introduction: Influenza viruses are characterised by a continuous antigenic variation which is reflected in a rapid molecular evolution. This evolution is a consequence of mutations and/or reassortments of the viral genome segments and contributes for the emergence of new strains of different pathogenicity, virulence and antiviral drug profile.

Objectives: Describe the morphology and characterise the genetic profile of the new influenza A(H1N1)v 2009 viruses circulating in Portugal
Methodology: Strains of the new influenza A(H1N1) variant were characterised morphologically by transmission electron microscopy and genetically by sequencing, analysis of mutations and phylogenetic analysis.
Results: The mutations P100S, S220T and I338V on the hemagglutinin, V106I and N248D on the neuraminidase and two synonymous mutations on the matrix gene were detected, when comparing with the sequence of the vaccine strain A/California/07/2009.
Discussion: The mutations found place the strains analysed within cluster 2 defined by Fereidouni et al, 2009 (vaccine strain is classified on cluster 1). In the hemagglutinnin gene were found mutations on antigenic sites, on a site of connection to cellular receptors and one mutation is probably associated with a new N-glycosilation site. The strains exhibit an antiviral drug profile of resistance to the M2 protein inhibitors. The profile to neuraminidase inhibitors will only be able to be determined in association with information generated by phenotypic studies which are already in course by our research group.

Key-words: Influenza virus A(H1N1)v, genetic characterisation, influenza pandemic.

/ Introdução

Os vírus influenza são caracterizados por uma contínua variação antigénica e consequentemente por uma rápida evolução molecular, que tornam imprevisíveis a extensão e a gravidade da doença e das epidemias que provocam. Estas variações antigénicas ocorrem essencialmente nas suas duas glicoproteínas de superfície – hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), e, consoante o mecanismo que está na sua origem, são classificadas como variação antigénica *minor* (*drift* antigénico) ou variação antigénica *major* (*shift* antigénico) [1,2]. A variação antigénica *minor* resulta da ocorrência de mutações pontuais na sequência de bases que codificam os aminoácidos que constituem as glicoproteínas de superfície (HA e/ou NA), possibilitando ao vírus escapar aos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro. Este é o processo de evolução dos vírus influenza que lhes permite reemergir todos os anos, numa base sazonal (geralmente durante o Inverno), podendo ocorrer tanto nos vírus do tipo A como nos vírus do tipo B [2]. Por sua vez, a variação antigénica *major* pode resultar quer da recombinação de segmentos do genoma de vírus de diferentes espécies ou linhagens, em que ocorre a substituição integral de um ou mais segmentos, quer da ocorrência de mutações adaptativas sucessivas [2,3]. Este segundo processo evolutivo ocorre unicamente nos vírus influenza do tipo A e conduz à emergência de vírus novos para os quais a população humana tem pouca ou nenhuma memória imunológica e que, deste modo, possuem a capacidade de se transmitirem rapidamente na população e causarem epidemias mundiais ou pandemias [4].

As pandemias de gripe tendem a ocorrer, a nível temporal, de forma pouco frequente e em intervalos irregulares. De acordo com os registos históricos, nos últimos 500 anos ocorreram 10 pandemias de gripe, das quais se destacam as 3 epidemias mundiais que emergiram no século XX: (1) a gripe pneumónica, em 1918/1919, causada pelo subtipo A(H1N1); (2) a pandemia de 1957/1958 que ficou conhecida como gripe Asiática, causada pelo subtipo A(H2N2); e, (3) a gripe de Hong-Kong, em 1968/1969, que resultou da emergência do subtipo A(H3N2) na população humana [5]. Nos últimos anos, particularmente desde 2003, verificaram-se epizootias provocadas por vírus influenza A(H5N1), em aves domésticas e selvagens, de grande dispersão geográfica e associadas a casos esporádicos e *clusters* de

doença grave no homem. Apesar do seu potencial zoonótico e do facto de terem conseguido ultrapassar a barreira da espécie, estes vírus não adquiriram a capacidade de se transmitirem eficazmente de pessoa-a-pessoa [5]. Esta capacidade foi, no entanto, demonstrada pela nova variante de vírus influenza A(H1N1) de origem suína que emergiu na população humana no início de 2009 e que, desta forma, se tornou responsável pela ocorrência da 1.ª pandemia de gripe no século XXI, declarada oficialmente a 11 de Junho de 2009 [6].

A variante pandémica de vírus influenza A(H1N1) foi inicialmente identificada, pelo *United Stated Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), em 17 de Abril de 2009 em amostras do tracto respiratório de duas crianças residentes no Estado da Califórnia. No entanto, a infecção por esta nova variante esteve também na origem dos casos não usuais de síndroma gripal observados anteriormente a esta data, em meados de Março, no México mas dos quais apenas foi possível obter confirmação laboratorial a 23 de Abril [7]. Esta nova variante A(H1N1) estabeleceu-se rapidamente na população e é actualmente a estirpe de vírus influenza que predomina em várias regiões a nível mundial. Os dados mais recentes, relativos a 23 de Abril de 2010, revelam a detecção de infecções por esta nova variante em mais de 214 países e a ocorrência de mais de 17853 mortes associadas [8].

A nível nacional, o 1.º caso de infecção por esta nova variante A(H1N1) foi confirmado a 4 de Maio de 2009. A maioria dos casos identificados até à data não têm apresentado gravidade do ponto de vista clínico, tendo sido confirmada a ocorrência de 122 mortes associadas a esta infecção até 26 de Março de 2010 (informação disponível em www.dgs.pt).

Neste artigo são apresentados os primeiros resultados obtidos no nosso país sobre o estudo evolutivo e caracterização do genoma das estirpes da variante pandémica de vírus influenza A(H1N1).

/ Material e Métodos

As estirpes da nova variante pandémica do vírus influenza A(H1N1), analisadas durante este trabalho, foram isoladas a partir de exsudados do tracto respiratório, recebidos no âmbito dos projectos de investigação *Vigilância e monitorização da susceptibilidade aos antivirais específicos para a gripe* e *Avaliação e caracterização da emergência das resistências aos antivirais específicos para a gripe no contexto da infecção respiratória aguda*, e através de uma parceria estabelecida com o Hospital de Curry Cabral.

Os exsudados foram colhidos a indivíduos que constituíram casos confirmados de infecção por vírus influenza A(H1N1)v. Estes produtos biológicos foram inoculados em células MDCK-SIAT1, resultando no isolamento das estirpes virais analisadas neste estudo.

Foi utilizada a técnica de contrastação negativa com molibdato de amónio a 2% com a finalidade de preparar uma das estirpes A(H1N1)v isolada, designada por A/Portugal/02/2009, para observação através do microscópio electrónico de transmissão Morgagni 268D EM (FEI).

TABELA I – MUTAÇÕES PRESENTES NAS REGIÕES CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS DOS VÍRUS INFLUENZA EM ESTUDO

	Mutações não sinónimas *	Mutações Sinónimas * †
PB2#	-	4
PB1#	-	2
PA#	P224S	3
HA§	P100S, S220T, I338V, (D239E)	2
NP#	V100I, L122Q	2
NA§	V106I, N248D, (Y155H)	1
M1§	-	2
M2§	-	-
NS1#	F103C, I123V	-
NS2#	-	-

* Mutações em relação à estirpe vacinal pandémica A/California/7/2009
† Número de mutações sinónimas
# Região codificante só disponível para A/Portugal/02/2009
§ Consideradas as mutações comuns às 18 estirpes sequenciadas
( ) Mutação representativa só presente em algumas estirpes

Sequenciou-se o gene da hemaglutinina (HA), o gene da neuraminidase (NA) e o gene da matriz (MP) de 17 estirpes isoladas, e todos os segmentos do genoma viral (HA, NA, MP, PB1, PB2, PA, NS e NP) da estirpe A/Portugal/02/2009. Resumidamente, para a sequenciação, procedeu-se à extracção do RNA viral utilizando o kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN). O RNA extraído foi transcrito e amplificado utilizando o procedimento adaptado do protocolo disponibilizado pelo CDC no site da WHO (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/sequencing_primers/en/index.html). As sequências nucleotídicas de cada gene foram obtidas utilizando o sequenciador automático de DNA ABI PRISM 3130XL Genetic Analyser, após reacção de sequenciação cíclica com o kit de BigDye Terminator V.1.1 e analisadas utilizando o software de análise genética Lasergene V.4.05 (DNASTAR Inc, USA).

Para cada segmento de genoma viral procedeu-se, posteriormente, ao alinhamento da sequência obtida com sequências de estirpes de vírus influenza A(H1N1)v escolhidas aleatoriamente no espaço e no tempo e com sequências de estirpes pertencentes a várias linhagens do vírus influenza (linhagem humana sazonal; aviária americana e eurasiática; suína clássica, eurasiática e americana e a do triplo recombinante surgido na época de 90). Estas sequências foram retiradas da base de dados *NCBI Influenza Virus Resource* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html). Com base nos alinhamentos efectuados foram construídas as árvores filogenéticas usando o metódo Neighbor-Joining, com o modelo de substituição nucleotídica Tamura-Nei através do software MEGA V.4.

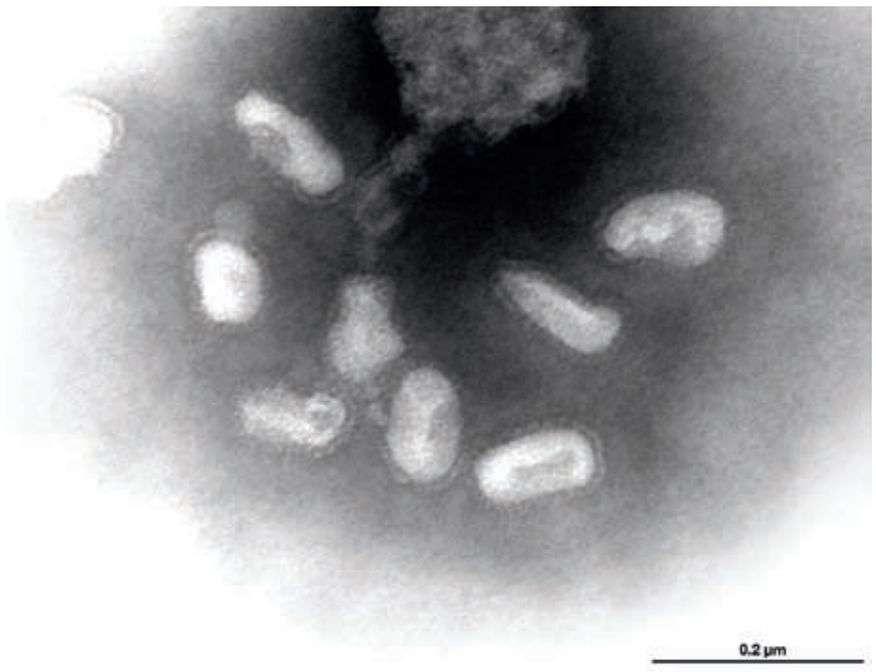


Figura 1 — Fotografia de microscopia electrónica de transmissão de partículas virais da estirpe A/Portugal/02/2009

/ Resultados

Através de microscopia electrónica de transmissão observou-se a morfologia das partículas virais da estirpe A/Portugal/02/2009, pertencente à nova variante A(H1N1) pandémica e isolada pelo nosso grupo de investigação. Como se pode observar na figura 1, as partículas virais apresentam a característica estrutura pleomórfica, com o predomínio de partículas esféricas e algumas partículas filamentosas. A maioria das partículas virais observadas apresentou um tamanho característico das partículas de vírus influenza (70-130nm). São ainda visíveis nestas partículas as espículas que se projectam a partir da superfície dos viriões e que correspondem às glicoproteinas de superfície, a HA e a NA.

As mutações sinónimas e não sinónimas detectadas no genoma viral das estirpes estudadas, quando comparado com o da estirpe vacinal A/California/07/2009, encontram-se descritas na tabela I.

A análise evolutiva das sequências obtidas para o gene da HA mostra que as 18 estirpes estudadas, pertencentes à nova variante A(H1N1), se encontram agrupadas num ramo filogenético caracterizado pela presença da mutação S220T quando comparadas com a estirpe A/California/07/2009 incluída na vacina pandémica. Neste ramo filogenético é possível observar que 12 dessas estirpes formam ainda um subgrupo, caracterizado pela presença da mutação D239E (figura 2A). As mutações P100S e I338V foram também identificadas em todas as estirpes incluídas neste estudo (tabela I). Salienta-se ainda, particularmente, a presença da mutação S202N na estirpe A/Portugal/14/2009 e da mutação K136N nas estirpes A/Portugal/01/2009 e A/Portugal/02/2009. Na árvore filogenética da HA é possível verificar a presença das estirpes A(H1N1)v no mesmo clade de estirpes da linhagem do triplo recombinante suíno e da linhagem suína clássica.

A análise genética do gene da NA mostra a presença das mutações V106I e N248D nas 18 estirpes analisadas. Filogeneticamente, a presença da mutação N248D relativamente à estirpe vacinal A/California/07/2009, caracteriza o ramo filogenético no qual se encontram estas estirpes. Nove estirpes formam ainda um subgrupo, caracterizado pela presença da mutação Y155H (figura 2B). No que respeita à analise genética da resistência aos inibidores da NA, nenhuma das mutações que se encontram descritas como estando associadas a esta resistência foi detectada nas sequências das estirpes analisadas. A árvore filogenética das sequências do gene da NA (figura 2B) evidencia ainda, comparativamente com as diversas linhagens de vírus influenza incluídas no estudo, uma maior proximidade das estirpes da nova variante pandémica com as estirpes pertencentes à linhagem suína euroasiática.

Por sua vez, a árvore filogenética correspondente ao gene polimórfico que codifica para as proteínas M1 e M2 (figura 2C), evidencia uma divisão das estirpes pertencentes à nova variante pandémica em dois subgrupos, encontrando-se todas as estirpes estudadas posicionadas no subgrupo 1. As estirpes A(H1N1)v pertencentes a este subgrupo apresentam duas mutações sinónimas de G para A nos nucleótidos 492 e 600, comparativamente com a sequência da estirpe vacinal (tabela I). Na árvore filogenética do gene MP pode-se observar ainda a semelhança genética existente entre as estirpes da nova variante A(H1N1) e as estirpes representantes da linhagem suína eurasiática. De entre as 5 mutações associadas à resistência aos inibidores da proteína M2, foi identificada a mutação S31N na região transmembranar da proteína M2 das estirpes A(H1N1)v em estudo.

No que respeita ao estudo mais detalhado da estirpe A/Portugal/02/2009, a sequência nucleotídica obtida para o segmento que codifica a proteína PB2 apresenta 4 mutações sinónimas relativamente à sequência codificante da estirpe A(H1N1)v vacinal (A/Califórnia/07/2009) (tabela I). A análise filogenética deste segmento do genoma (Figura 2D) mostra que a estirpe nacional e as sequências das estirpes da nova variante A(H1N1)v analisadas formam um clade comum. Adicionalmente, verifica-se uma proximidade genética deste clade com o das estirpes representantes da linhagem

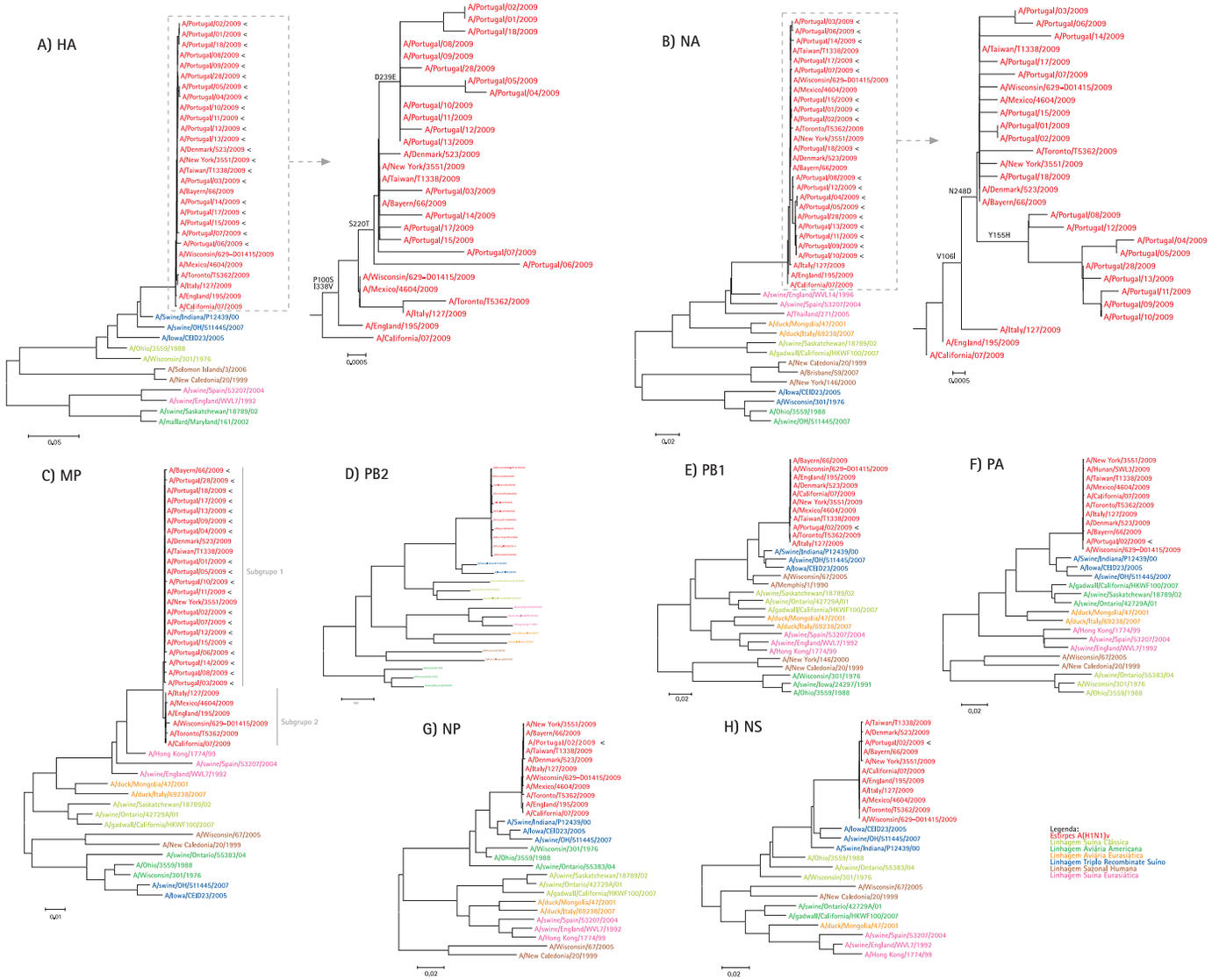


Figura 2 – Árvores filogenéticas do alinhamento das sequências das estirpes isoladas com sequências de várias estirpes da nova variante do vírus A(H1N1) 2009 e com sequências de estirpes representantes de várias linhagens do vírus influenza. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de Neighbor Joining com o modelo de substituição nucleotidica Tamura-Nei.

do triplo recombinante suíno, identificando, para este segmento, esta linhagem como a geneticamente mais semelhante à estirpe analisada e às estirpes A(H1N1)v.

No que diz respeito ao segmento que codifica para a proteína PB1 e para a proteína PB1-F2, não foram detectadas mutações na sequência de aminoácidos em comparação com a sequência da estirpe incluída na vacina pandémica, tendo sido, no entanto, detectadas duas mutações sinónimas (tabela I). Em relação à codificação da proteína PB1-F2, através da ORF (+1) deste segmento, observa-se a presença de um codão stop na posição do aminoácido 12, dando origem a uma proteína PB1-F2 não funcional. A análise filogenética do alinhamento das sequências da região codificante da PB1 (figura 2E) classifica as estirpes A(H1N1)v e a estirpe A/Portugal/02/2009 num clade único. Novamente, o clade mais próximo corresponde ao das estirpes da linhagem do triplo recombinante suíno.

A sequência da proteína PA da estirpe A/Portugal/02/2009 apresenta a mutação P224S e, a nível nucleotídico, três mutações silenciosas, em comparação com a estirpe vacinal pandémica A/Califórnia/07/2009 (tabela I). A análise filogenética referente ao alinhamento da sequência da região codificante do gene PA (figura 2F) evidencia (1) a classificação da estirpe pandémica nacional e das restantes estirpes A(H1N1)v no mesmo clade e (2) novamente uma maior semelhança genética deste com o clade formado pelas estirpes representantes da linhagem do triplo recombinante suíno.

No gene que codifica a proteína NP da estirpe A/Portugal/02/2009 foram detectadas as mutações V100I, L122Q e duas mutações sinónimas, em relação à sequência da estirpe vacinal pandémica (tabela I). Tal como nos segmentos do genoma já analisados, na árvore filogenética deste segmento (figura 2G) pode-se observar as estirpes da variante pandémica, incluindo a A/Portugal/02/2009, agrupadas num clade cujo ramo mais próximo inclui a linhagem do triplo recombinante suíno e a linhagem suína clássica.

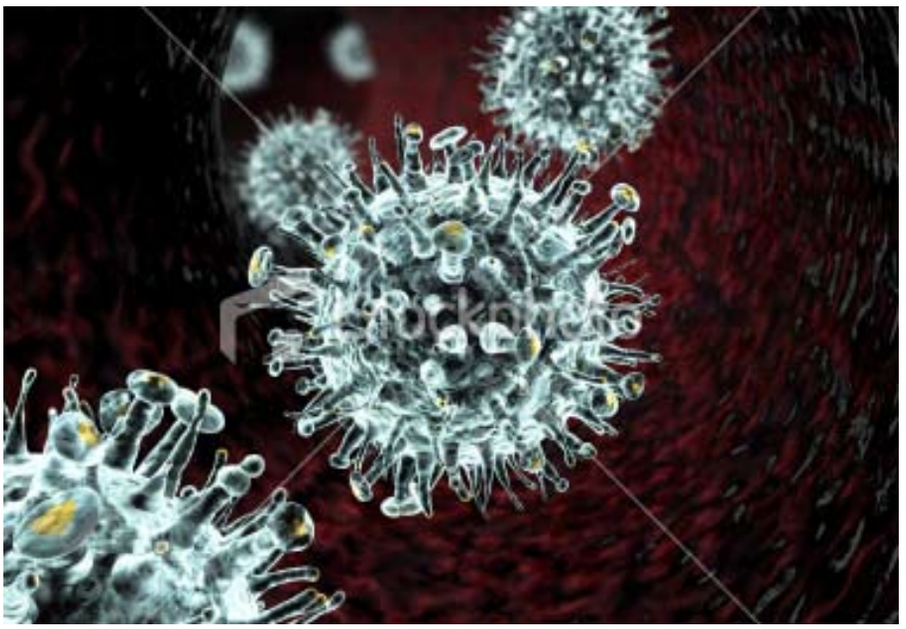
Por último, no que diz respeito ao gene polimórfico NS, que codifica a proteína NS1 (nt 1-660) e a proteína NS2 (nt 1-30, 503-838), na região codificante da proteína NS1 verificou-se a presença das mutações F103C e I123V (tabela I). Esta última mutação, presente em algumas das estirpes pandémicas analisadas, é responsável pela formação de um subgrupo na árvore filogenética deste gene (figura 2H). As estirpes A(H1N1)v apresentam como clade geneticamente mais semelhante, o da linhagem do triplo recombinante suíno.

/ Discussão

Os resultados obtidos com a realização deste estudo permitem conhecer características específicas de estirpes A(H1N1)v em circulação no nosso país, contribuindo para a análise evolutiva da nova variante pandémica A(H1N1) emergente em 2009.

O resultado da análise filogenética dos segmentos genómicos das estirpes isoladas está em conformidade, como esperado, com a origem desta nova variante por recombinação entre um vírus da linhagem norte-americana do triplo recombinante suíno e um vírus da linhagem suína eurasiática. Os segmentos PB2, PB1, PA, HA, NP e NS apresentam-se geneticamente semelhantes à linhagem do triplo recombinante suíno e os segmentos da NA e M à linhagem suína eurasiática.

Apesar de se ter vindo a observar uma elevada semelhança genética entre as



várias estirpes do vírus A(H1N1)v analisadas em vários países e regiões a nível mundial, encontram-se actualmente descritos dois *clusters* evolutivos [9]. Os resultados obtidos neste estudo para o gene da HA, NA e MP, permitem verificar, através das mutações identificadas, que as 18 estirpes A(H1N1)v isoladas no nosso país se encontram incluídas no *cluster* 2 definido por Fereidouni *et al*, 2009 enquanto a estirpe vacinal A/California/07/2009 se encontra incluída no *cluster* 1. É, no entanto, importante ter em consideração o facto desta divisão se basear num número limitado de mutações no genoma viral (4 mutações não sinónimas, das quais uma no local antigénico da HA, e 5 mutações sinónimas). Adicionalmente, as mutações S202N, S220T e D239E, identificadas na HA de estirpes isoladas em Portugal, localizam-se em sítios antigénicos [10]. O aminoácido 239 constitui ainda um dos locais de ligação da hemaglutinina aos receptores celulares [11] e a mutação K136N encontra-se provavelmente associada a um novo local de N-glicosilação. Para clarificar o efeito destas alterações genéticas nas características antigénicas e fenotípicas das estirpes analisadas, considera-se essencial conjugar esta informação com estudos antigénicos e serológicos.

As estirpes A(H1N1)v analisadas revelaram ser resistentes aos inibidores da proteína M2, sendo este perfil antivírico característico das estirpes pertencentes à linhagem suína euroasiática. A ausência de mutações no gene da NA associadas ao desenvolvimento de resistência aos inibidores da NA não permite, por si só, determinar o perfil antivírico das estirpes A(H1N1)v analisadas. A informação genética tem necessariamente que ser conjugada com dados fenotípicos. Para tal, encontram-se actualmente em curso, pelo mesmo grupo de investigação, ensaios fenotípicos de avaliação da susceptibilidade das estirpes a estes antivíricos.

Como consequência da grande capacidade evolutiva apresentada pelos vírus influenza, que se manifesta através de mutações nas glicoproteínas de superfície e na possibilidade de ocorrência de novos eventos de recombinação, é fundamental manter a investigação e monitorização das estirpes em circulação a nível nacional, de forma a possibilitar a detecção atempada de qualquer alteração que possa estar associada a uma maior patogenia, virulência ou desenvolvimento de resistência aos antivirais específicos para a gripe.

/ Bibliografia

1. Cox N J, Subbarao K. Influenza. Lancet 1999; 354: 1277-1282.
2. Rebelo-de-Andrade H, Diniz A, Froes F. Gripe. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Pneumologia; 2003.
3. Rebelo-de-Andrade H. Introdução aos conceitos de gripe sazonal, gripe pandémica e de gripe aviária. In Rebelo-de-Andrade et al., Gripe sazonal, de transmissão zoonótica e pandémica - Diagnóstico virológico. INSA, 2006, pg. 5-9.
4. Osterhaus A, de Pooter D. 101 Questions & Answers on Influenza. Maarssen: Elsevier; 2009.
5. Rebelo-de-Andrade H. Revisão das principais características epidemiológicas e virológicas do vírus influenza A(H5N1). Rev Port Doenças Infec 2007; 3(1): 7-11.
6. WHO. New influenza A(H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009. Week Epidemiol Rec 2009; 25(84): 249-257. Disponível online em http://www.who.int/wer
7. WHO. New influenza A(H1N1) virus infections: global surveillance summary, May 2009. Week Epidemiol Rec 2009; 20(84): 173-179. Disponível online em http://www.who.int/wer
8. WHO, 2009. Pandemic (H1N1) 2009 – update 97. Disponível online em http://www.who.int/csr/don/2010_04_23a/en/index.html .
9. Fereidouni SR, Beer M, Vahlenkamp T, Starick E. Differentiation of two distinct clusters among currently circulating influenza A(H1N1)v viruses, March-September 2009. Euro Surveill 2009; 14(46):pii=19409;
10. Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, Takada A. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. PLoS One 2010; 5(1):e8553;
11. Yang H, Carney P, Stevens J. Structure and Receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin. PLoS Curr Influenza 2010;RRN1152.