

Factores virales e inmunológicos del hospedero que afectan la gravedad de la infección por virus de influenza

Aldo Barrera^{1^}, Tamara García^{1,2^}, Karla Tapia¹ y Rafael A. Medina^{1,2,3*}

¹Laboratorio de Virología Molecular; Departamento de Enfermedades Infecciosas e Inmunología Pediátrica, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. ²Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia.

³Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai.

[^]contribución compartida; * Autor correspondiente.

RESUMEN

A pesar del gran desarrollo en la investigación molecular del virus influenza, y la existencia de vacunas y antivirales que permiten combatir la infección, la gripe sigue siendo una de las enfermedades respiratorias más importantes. Esta causa estacionalmente un número substancial de enfermedades e incluso la muerte en la población humana, generando además una carga económica considerable para los sistemas de salud a nivel mundial. Numerosos factores pueden modular la gravedad de esta enfermedad. Estos están relacionados con interacciones complejas donde influyen el genotipo del patógeno, la respuesta inmune, las condiciones preexistentes y la susceptibilidad (o predisposición) del hospedero, como también los factores ambientales que favorecen la infección. La naturaleza multifactorial de la patogénesis del virus de influenza enfatiza la necesidad de nuevos enfoques para entender la evolución clínica y desarrollar mejores vacunas y opciones de tratamiento para combatir la enfermedad.

Los virus de Influenza A (VIA) son miembros de la familia de virus *Orthomyxoviridae* y constituyen los agentes etiológicos de la patología conocida como gripe en humanos. La información genética del VIA está contenida en ocho segmentos de ARN de hebra simple y polaridad negativa, que pueden codificar hasta 12 proteínas, incluyendo dos importantes antígenos de superficie: las glicoproteínas Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA)¹.

El hospedero principal del VIA son las aves acuáticas silvestres; no obstante, también infecta aves de corral, cerdos, caballos y perros, entre otros. La habilidad de estos virus de infectar diversos hospederos permite generar cepas con re-arreglos genómicos, debido al intercambio de segmentos del genoma entre distintas cepas, originando virus antigénicamente diferentes (fenómeno conocido como cambio antigénico). Es así como los VIA han sido clasificados en subtipos de acuerdo a las propiedades antigénicas de sus glicoproteínas HA y NA. A la fecha se han descrito cepas de virus de 18 subtipos de HA y 11 de NA, de los cuales los subtipos H1 al H16 y N1 al N9 se han encontrado en aves silvestres, mientras que

los subtipos H17 y H18, y los N10 y N11, sólo se han identificado recientemente en murciélagos². Actualmente en humanos sólo circulan los subtipos H1N1 y H3N2. Por tanto, cepas de subtipos distintos contra las cuales la población carece de anticuerpos, tienen el potencial de generar nuevas pandemias³.

Este ha sido el caso de todas las pandemias de las que se tiene información genética. La gran pandemia del 1918, también denominada la “gripe española”, causada por una cepa H1N1 de origen aviar, ha sido considerada la más devastadora en los registros de la medicina moderna⁴. En 1957, una cepa H2N2, generada desde la combinación de genes de VIA H2N2 aviar y H1N1 humano, fue introducida en la población dando lugar a la pandemia conocida como la gripe asiática. Asimismo, en 1968 la pandemia de Hong-Kong H3N2 fue generada por un re-arreglo entre la cepa H2N2 humana y una cepa H3 de origen aviar. Luego, en 1977 reapareció la cepa H1N1, la que desde entonces co-circula junto a la cepa H3N2⁵. La última pandemia, ocurrida el año 2009, se debió a la introducción de la cepa denominada pdmH1N1-2009. Esta se originó en cerdos, donde se evidencia un re-arreglo de virus H1N1 humano con virus aviares y clásicos de origen porcino⁶. Este brote emergió repentinamente en la primavera del hemisferio Norte, posiblemente en México, y se caracterizó por su rápida transmisión en la población humana a nivel global, reemplazando la cepa H1N1 estacional circulante en ese momento^{1,3}.

Desde los 90s se han descrito además infecciones esporádicas por cepas H5N1 y H7N9 de VIA de origen aviar, principalmente en el Sureste de Asia, con rango de mortalidad entre 24 y 100%⁷. Esto ha generado gran preocupación a nivel mundial por el riesgo que estas cepas adquieran la capacidad de ser transmitidas eficientemente en humanos, dada la susceptibilidad de la población por falta de inmunidad previa, lo que podría causar una nueva pandemia de características altamente patogénicas⁸.

FACTORES DE VIRULENCIA

Dada la presión selectiva inmunológica que se genera en las glicoproteínas de superficie HA y NA, se inducen >>>

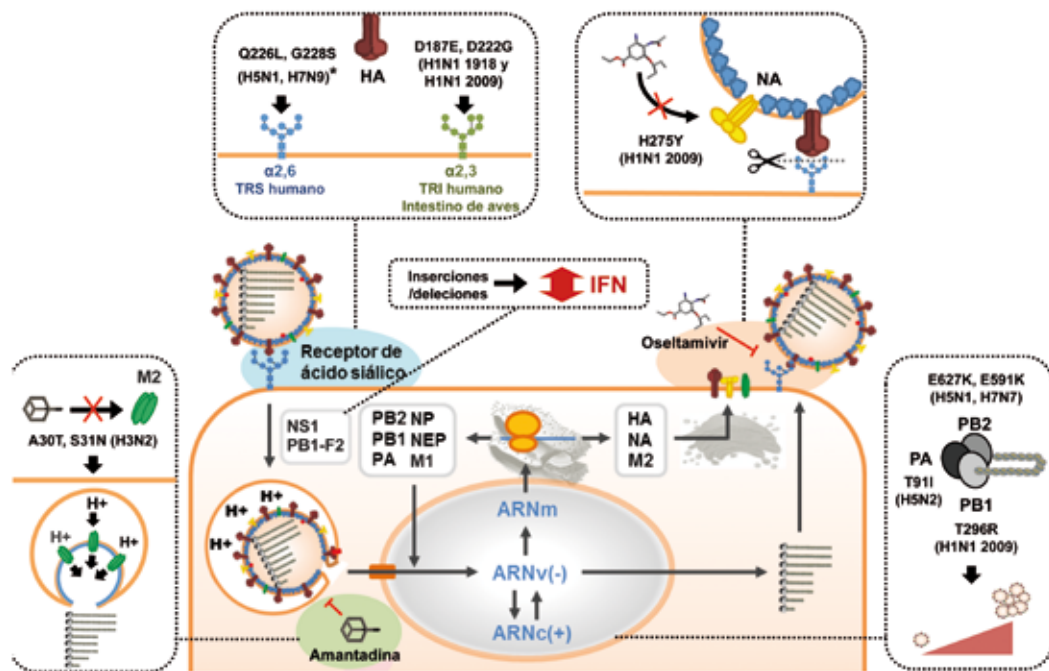


Figura 1

Marcadores moleculares de virulencia en el ciclo replicativo del virus de influenza A. Durante la infección, el virus puede adquirir sustituciones y/o deleciones en su genoma a través de presión selectiva en proteínas virales que median el ingreso a la célula (HA, M2), pueden incrementar la replicación (PB2, PB1, PA), producir la inhibición de la respuesta celular antiviral (NS1, PB1-F2), la inducción de apoptosis (PB1-F2) o la liberación eficiente de los viriones (NA), entre otras. NA y M2 son blancos de drogas antivirales que además pueden adquirir mutaciones de resistencia. Las mutaciones se muestran en numeración H1 (*= numeración H3). TRS: tracto respiratorio superior. TRI: tracto respiratorio inferior. IFN: interferón.

>>> cambios antigénicos que permiten la evolución del virus. Así, se generan y conservan mutaciones capaces de evadir la respuesta inmune humoral (de anticuerpos neutralizantes), lo que además resulta en una reducción de la efectividad de las vacunas actuales. Esto además proporciona al virus la capacidad de infectar nuevos hospederos y de circular de forma estacional en la población.

La adquisición constante de mutaciones en el genoma del virus se debe a que la polimerasa viral carece de la capacidad de autocorrección durante la replicación⁹. Por ejemplo, en la HA se han descrito mutaciones en

superior expresa principalmente ASs con enlaces α -2,6, mientras que el tracto respiratorio inferior (TRI) expresa predominantemente ASs α -2,3. La mutación D222G de cepas pdmH1N1-2009 produce un cambio de afinidad hacia α -2,3, lo cual facilitaría al virus expandir la infección al TRI¹⁰, y generar una neumonía viral. De hecho, esta mutación se ha detectado frecuentemente en pacientes con infecciones graves¹¹. Asimismo, la preferencia al receptor puede afectar la transmisibilidad del virus, permitiendo que virus aviares puedan infectar humanos¹². También existen mutaciones sobre proteínas internas del virus, que modulan la capacidad replicativa o la respuesta antiviral de la célula. Se sabe que varias de estas sustituciones son capaces de modificar directamente la virulencia y/o aumentar la patogenicidad del virus, siendo clasificados como marcadores de virulencia (Figura 1). Ejemplos de esto constituyen las mutaciones sobre proteínas que conforman el complejo de la polimerasa viral, como E627K y E591K en la proteína básica 2 (PB2) de virus aviares, necesarias para poder replicar en mamíferos a temperaturas entre 33 y 37°C^{13,14}. Estos cambios también ocurren en otras proteínas de la polimerasa, que aumentan la síntesis u otorgan una ventaja replicativa en cepas como la del 1918 y las cepas aviares altamente patogénicas. Por otro lado, las cepas H5 y H7 se caracterizan por poseer un sitio de corte múltiple en la HA, las que pueden

LAS CEPAS H5 y H7 se caracterizan por poseer un sitio de corte múltiple en la HA, las que pueden ser procesadas por proteasas intracelulares ubicuas en múltiples órganos. Por tanto, estos virus pueden también replicar fuera del tracto respiratorio, lo que puede llevar a un incremento en la virulencia de la enfermedad debido a una falla multiorgánica.

el dominio de unión al receptor, que pueden generar cambios de afinidad y especificidad hacia receptores de ácidos siálicos (ASs) con conformaciones α -2,6 o α -2,3. Esto es relevante ya que en humanos el tracto respiratorio

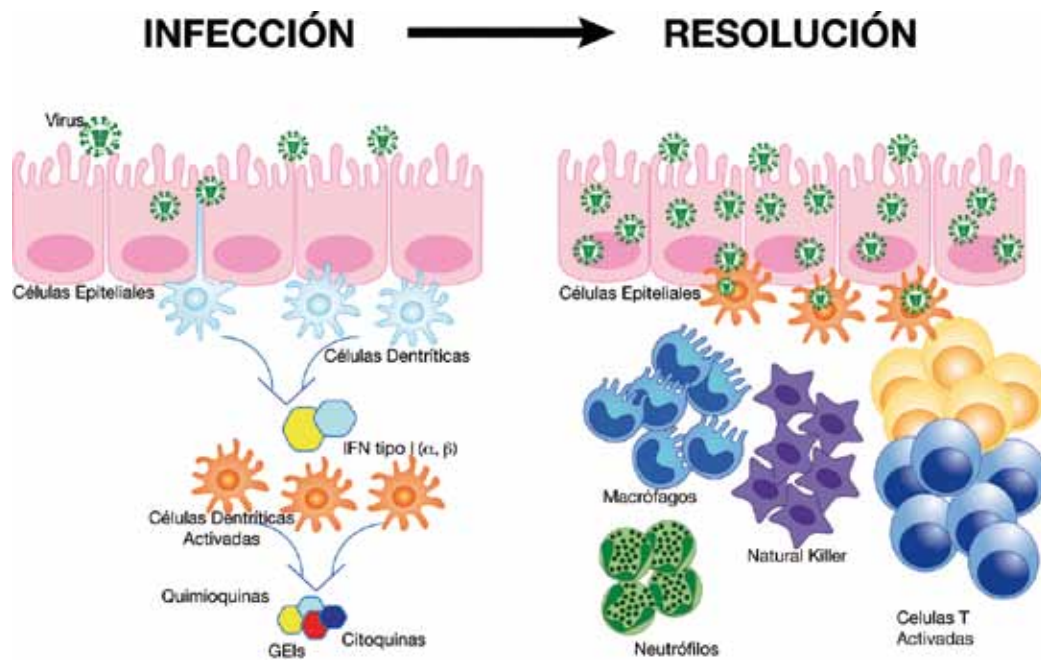


Figura 2

Respuesta inmune frente a la infección por virus de influenza A. La infección se inicia cuando el virus infecta las células epiteliales y las células del sistema inmune presentes en el tracto respiratorio, lo que induce la secreción de Interferón (IFN) tipo I, citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y eicosanoides. Los IFNs de tipo I (α y β), producidos por células epiteliales, macrófagos, neumocitos, células dendríticas (DCs) y DCs plasmocitoides (pDCs), activan en las células vecinas la expresión de los denominados genes estimulados por IFN (GEIs), responsables de los efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores del IFN. Las citoquinas pro-inflamatorias, tales como las interleuquinas (IL)-1 β , 6 y 8, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , MIP-1 β , e IFN- γ , entre otras, y los eicosanoides inducen inflamación local y sistémica. Mientras que las quimioquinas reclutan neutrófilos, monocitos y células *Natural Killers* (NK), median la eliminación o *clearance* viral. Adicionalmente, las DCs inducen la activación de los linfocitos T (LT) CD4+ y CD8+, el último mecanismo de defensa a cargo de mediar la eliminación de las células infectadas por el virus y por tanto la resolución de la infección.

ser procesadas por proteasas intracelulares ubicuas en múltiples órganos¹. Por tanto, estos virus pueden replicar fuera del tracto respiratorio, lo que puede llevar a un incremento en la virulencia y la enfermedad debido a una falla multiorgánica¹⁵. Se han descrito también mutaciones que inhiben la función de la proteína no estructural 1 (NS1), que es un antagonista de la respuesta de interferón (IFN) de la célula hospedera, la que es esencial para la replicación temprana del virus¹⁶.

Otras mutaciones también pueden ser generadas frente a tratamientos con antivirales, lo que puede resultar en cepas resistentes. El ejemplo más común se ha observado con oseltamivir (Tamiflu) que actúa como inhibidor del sitio catalítico de NA, la cual media la liberación de los viriones desde la célula hospedera. Durante el tratamiento, mutaciones como H275Y anulan la unión del compuesto activo del fármaco a la proteína¹⁷. Durante el 2007-2008 este tipo de mutaciones aparecieron espontáneamente en la cepa H1 estacional pre-pandémica, lo que en ese momento dejó obsoleto el uso de Tamiflu contra estos virus¹⁸. Desde ese entonces se ha evidenciado la necesidad de desarrollar nuevos inhibidores contra el virus, lo que constituye una área activa de investigación.

Es posible que la diversidad genética en las cepas circulantes contribuya anualmente al número de

casos de pacientes jóvenes, sanos y no susceptibles que desarrollan una enfermedad grave, donde la aparición de mutaciones que confieren al virus una mayor virulencia, podría influenciar el desarrollo de la enfermedad (*Figura 1*). Actualmente, gracias a tecnologías de secuenciación masiva o *deep-sequencing* es posible determinar polimorfismos de nucleótidos simple (PNS) en el genoma del VIA, y su representatividad en una población viral. Por tanto, el estudio de las cuasi-especies virales (o diversidad genética) que se produce durante la infección de un mismo hospedero, constituye una herramienta poderosa para investigar posibles factores de virulencia emergentes. Esto, en el futuro, podría ayudar a determinar la magnitud de la enfermedad que se desarrollará y/o el tratamiento que se deberá suministrar en un individuo particular.

RESPUESTA INMUNE

La infección con el VIA comienza con su ingreso al hospedero por la cavidad nasal u oral, donde se encuentra con el mucus que recubre el epitelio respiratorio, barrera que debe atravesar para infectar tanto las células epiteliales, como las del sistema inmune (*Figura 2*). Al cabo de 48 horas se inicia la sintomatología, caracterizada por fiebre alta ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), malestar general, mialgia, tos, secreción nasal, y >>>

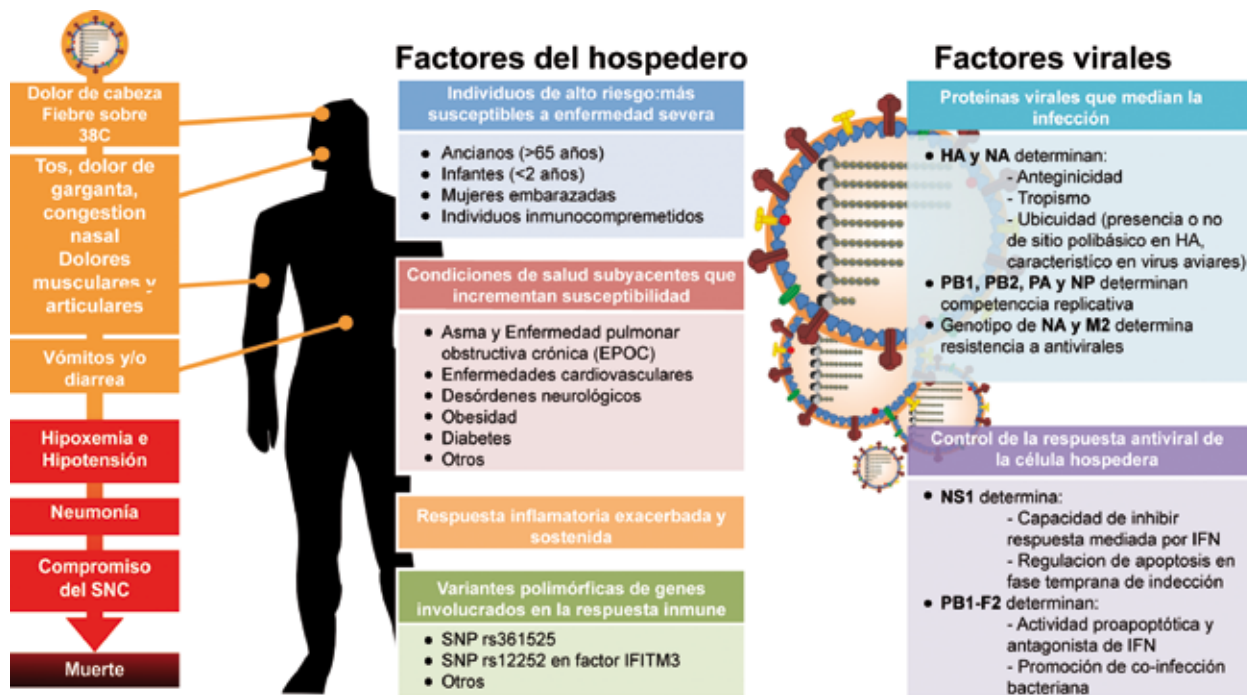


Figura 3

Conjunto de factores del hospedero y virales que median la gravedad de la infección causada por el virus de influenza A. La enfermedad conocida como gripe se manifiesta tempranamente como un resfrío común, que tiene la potencialidad de evolucionar en complicaciones que desencadenan una falla sistémica, lo cual depende de diversos factores. Entre estos se incluyen las edades extremas, las condiciones patológicas e inmunológicas del individuo, y los factores virales que determinan la patogenia del virus.

>>> dolor de cabeza y abdominal, entre otros (Figura 3). Estos síntomas se asocian con la activación del sistema inmune innato inducida principalmente por la respuesta de Interferón (IFN), generando una fase inflamatoria, que dura aproximadamente 4 a 5 días¹⁹. En esta etapa, el ARN viral en las células infectadas es reconocido por receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), lo que gatilla la secreción de IFN tipo I, citoquinas pro-inflamatorias, eicosanoides y quimioquinas^{20, 21} (Figura 2). Los IFNs de tipo I (α y β) son producidos por células epiteliales, macrófagos, neumocitos, células dendríticas (DCs) y DCs plasmocitoides (pDCs), y activan en las células vecinas los genes estimulados por IFN (GEIs), que son responsables de los efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomodulatorios del IFN^{20, 21}. Por otra parte, las citoquinas pro-inflamatorias (como las interleuquinas 1 β , 6, 8, y TNF- α , MIP-1 β e IFN- γ , entre otras) y los eicosanoides (derivados de ácidos grasos) inducen inflamación local y sistémica, generando fiebre y letargia. Mientras, las quimioquinas reclutan neutrófilos, monocitos y células *Natural Killers* (NK) (Figura 2). Estas últimas son las principales mediadoras de la eliminación o *clearance* viral, ya que

reconocen y lisan las células epiteliales infectadas, las que son eliminadas por los monocitos, neutrófilos y macrófagos alveolares. Además las DCs activan a los linfocitos T (LT) CD4+ o *helper* y CD8+ o citotóxicos, los que también participan en la eliminación de las células infectadas. Durante la etapa final de la infección además se activan los linfocitos B, que maduran a células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos contra los epítopes del VIA contraído, ayudando a neutralizar la infección²². El conjunto de esta respuesta, en un individuo inmunocompetente, resulta en la resolución de la enfermedad en aproximadamente 4 a 5 días^{20, 21} (Figura 2). Este proceso coordinado del sistema inmune promueve una respuesta adecuada capaz de superar la infección por dos mecanismos: reconociendo y eliminando eficientemente al virus (hospedero resistente), y/o reduciendo el impacto negativo al controlar el daño tisular que la infección e inflamación generada (hospedero tolerante). En contraste, una respuesta inmune innata exacerbada puede resultar en la inducción de una “tormenta de citoquinas” que produce una inflamación desregulada que contribuye aún más a la enfermedad,

provocando un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). Esto junto al daño tisular generado por el virus puede inducir una falla multiorgánica, la que incluso puede producir la muerte. Las bases moleculares del por qué algunos individuos son “hospederos altamente susceptibles” a ciertas enfermedades virales pero no a otras, no son del todo claras, y se establece como uno de los retos de la medicina moderna.

FACTORES DEL HOSPEDERO RELACIONADOS CON LA GRAVEDAD DE LA INFECCIÓN

Las pandemias previas al 2009 se caracterizaron por causar enfermedad grave en ciertos individuos o en las poblaciones más susceptibles. Sin embargo, la optimización de la vigilancia clínica durante la pandemia del año 2009, permitió la identificación de nuevos factores de riesgo clínicos en la población (*Figura 3*), pero con una comprensión limitada de los mecanismos inmunológicos involucrados y de las variaciones genéticas que pudiesen contribuir a la enfermedad. A la fecha se han identificado factores de riesgo para el VIA, tales como edad extrema (<2 años y >65 años), embarazo (especialmente durante el 3er trimestre), comorbilidades (asma, obesidad, diabetes, condiciones cardíacas, etc.) y compromiso inmunológico. No obstante, estos sólo explican una fracción de los casos graves²³⁻²⁵. La infección causada por la cepa pdmH1N1-2009 presentó altas tasas de morbilidad entre los adultos de edad media y jóvenes sanos, muchos de ellos sin comorbilidades^{26,27,29}. Por ende, se estima que existen múltiples factores que podrían dar cuenta de las altas tasas de complicaciones observadas durante la enfermedad, las que en muchos casos convergen en algún grado de disfunción del sistema inmune, lo cual pudiese afectar la habilidad de un individuo de montar una respuesta adecuada frente a la infección. Así también, la presencia de polimorfismos en genes relacionados con la activación y señalización de la respuesta inmune pueden estar asociados al desarrollo de una enfermedad grave debido a la incapacidad de un individuo de eliminar la infección³⁰.

POLIMORFISMOS EN GENES DEL SISTEMA INMUNE

La identificación de polimorfismos genéticos que otorgan susceptibilidad para contraer o cursar una enfermedad viral grave, se ha establecido como un nuevo paradigma de la medicina moderna. Este enfoque ha ayudado a determinar, por ejemplo, el rol de IL-28B (también conocida como IFN λ 3) en la respuesta al tratamiento contra Hepatitis C (una expresión alta de esta citoquina correlaciona con una respuesta insuficiente al tratamiento)³¹ y la infección

producida por el hantavirus Andes (la expresión alta de IL-28B se asocia a una enfermedad grave)³². Mientras, que para el VIA, los niveles basales e intermedios de esta citoquina se han relacionado con un incremento de la seroconversión generada por la vacuna³³.

Durante la pandemia del 2009 se identificaron algunos PNS asociados a la respuesta inmune y la gravedad de la infección por VIA. Algunos de estos son el gen del receptor de quimioquina C-C tipo 5 (CCR5), presente en macrófagos, LT y DCs, encargados de mediar la migración de estas poblaciones leucocitarias³⁴, y otro el gen de los receptores tipo inmunoglobulina de células Killer (KIR), que comprenden un grupo de receptores presentes en las células NK con capacidades inhibitorias, lo que permite modular la actividad de estas células³⁵, entre otros³⁶. También se han identificado otros PNSs, como el PNS rs361525 en el gen del factor de necrosis tumoral (TNF), donde el alelo menor (A) es más frecuente en individuos infectados³⁷; o el PNS rs12252 en el gen de la proteína transmembrana inducible por interferón 3 (IFITM3), que genera una variante no funcional debido a una delección de

LAS PANDEMIAS previas al 2009 se caracterizaron por causar enfermedad grave en ciertos individuos o en aquellas poblaciones más susceptibles. Sin embargo, la optimización de la vigilancia clínica durante la pandemia del año 2009, permitió la identificación de nuevos factores de riesgo clínicos en la población.

21 aminoácidos en el extremo N-terminal, que esta asociada a un incremento en la replicación viral y se encontró con más frecuencia en individuos caucásicos que desarrollaron un cuadro grave de influenza^{38,39}. No obstante, existen datos controversiales sobre el rol de IFITM3 en distintas etnias, dado que un estudio reciente en la población China no encontró correlación entre este PNS en particular y una enfermedad grave⁴⁰. Por otro lado, un estudio reciente de un cuadro grave de influenza durante una infección primaria en un individuo pediátrico identificó mutaciones nulas en el factor de transcripción regulatorio de interferón 7 (IRF7), proteína encargada de amplificar la producción de IFN en pDCs, que resultan en una proteína no funcional. Esto genera una falla en la amplificación del IFN tipo I y III mediada por IRF7, la que parece ser requerida para la protección contra una infección primaria con el VIA⁴¹. Por tanto, un cuadro grave de influenza puede producirse debido a PNSs particulares de genes involucrados en la respuesta inmune del hospedero, lo que enfatiza la necesidad de establecer >>>

»» la relevancia o prevalencia de estos polimorfismos en distintas poblaciones.

CONCLUSIONES

A pesar de la extensa investigación que se ha realizado sobre el virus de influenza, aún falta tener un entendimiento más acabado a nivel molecular sobre los factores virales y del hospedero que modulan la enfermedad. Por ende, se requiere el desarrollo de nuevas investigaciones realizadas en modelos experimentales apropiados, en conjunto con estudios básicos-clínicos que sean capaces de integrar el uso de nuevas ciencias "Ómicas" tales como análisis genómicos, transcriptómicos, proteómicos, entre otros. Estos estudios tienen el gran potencial de aportar nuevos conocimientos que generen un impacto en la salud de la población. Así se podrán identificar nuevos blancos terapéuticos contra proteínas virales y además permitirá dilucidar vías específicas, activadas diferencialmente entre individuos con una susceptibilidad diversa, lo

A PESAR DE LA EXTENSA INVESTIGACIÓN, se requiere el desarrollo de nuevos estudios realizados en modelos experimentales apropiados, en conjunto con estudios básicos-clínicos que sean capaces de integrar el uso de nuevas ciencias "Ómicas" tales como análisis genómicos, transcriptómicos o proteómicos, entre otros.

que a su vez ayudará a establecer el rol de variantes genéticas que determinan la susceptibilidad de distintas poblaciones del mundo, ante diversos patógenos.

AGRADECIMIENTOS

El Laboratorio de Virología Molecular está financiado por el Proyecto Anillo de Investigación en Ciencia y Tecnología - ACT1408: Patogénesis Molecular de Virus Emergentes de CONICYT Chile, por el Proyecto Puente UC No. 1/2015, y por el proyecto P09/016-F del Programa Iniciativa Científica Milenio del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo de Chile.

PARA LEER MÁS

F McNab, K Mayer-Barber, A Sher, A Wack and A O'Garra. "Type I interferons in infectious disease". *Nat Rev Microb* 15 (2015) 87-103.

JL Casanova. "Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection". *Proc Natl Acad Sci* (2015). doi/10.1073/pnas.1521644112.

S Tripathi, MO Pohl, Y Zhou, A Rodriguez-Frandsen, G Wang, DA Stein, HM Moulton, P DeJesus, J Che, LC Mulder, E Yángüez, D Andenmatten, L Pache, B Manicassamy, RA Albrecht, MG Gonzalez, QNguyen, A Brass, S Elledge, M White, S Shapira, N Hacohen, A

Karlas, TF Meyer, M Shales, A Gatorano, JR Johnson, G Jang, T Johnson, E Verschuere, D Sanders, N Krogan, M Shaw, R König, S Stertz, A García-Sastre, SK Chanda. "Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding". *Cell Host Microbe* 18 (2015) 723-735.

JN Mandl, R Ahmed, LB Barreiro, P Daszak, JH Epstein, HW Virgin, MB Feinberg. "Reservoir Host Immune Responses to Emerging Zoonotic Viruses". *Cell* 160 (2015) 20-35.

BIBLIOGRAFÍA

1. Medina, R.A. & Garcia-Sastre, A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microb* 9, 590-603 (2011).

2. Tong, S. et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9, e1003657 (2013).

3. Palese, P. & Wang, T.T. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis. *MBio* 2 (2011).

4. Garcia-Sastre, A. & Whitley, R.J. Lessons learned from reconstructing the 1918 influenza pandemic. *J Infect Dis* 194 Suppl 2, S127-32 (2006).

5. Khiabani, H., Trifonov, V. & Rabadan, R. Reassortment patterns in Swine influenza viruses. *PLoS Curr* 1, RRN1008 (2009).

6. Smith, G.J. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122-5 (2009).

7. Uyeki, T.M. Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: review of clinical issues. *Clin Infect Dis* 49, 279-90 (2009).

8. Fineberg, H.V. Pandemic preparedness and response--lessons from the H1N1 influenza of 2009. *N Engl J Med* 370, 1335-42 (2014).

9. Drake, J.W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4171-5 (1993).

10. Shang, C., Whittleston, C.S., Sutherland-Cash, K.H. & Wales, D.J. Analysis of the Contrasting Pathogenicities

Induced by the D222G Mutation in 1918 and 2009 Pandemic Influenza A Viruses. *J Chem Theory Comput* 11, 2307-2314 (2015).

11. Chen, H. et al. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. *J Infect Dis* 201, 1517-21 (2010).

12. Imai, M. & Kawaoka, Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Curr Opin Virol* 2, 160-7 (2012).

13. Hatta, M. et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog* 3, 1374-9 (2007).

14. Yamada, S. et al. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog* 6, e1001034 (2010).

15. de Jong, M.D. et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12, 1203-7 (2006).

16. Hale, B.G. Conformational plasticity of the influenza A virus NS1 protein. *J Gen Virol* 95, 2099-105 (2014).

17. Gubareva, L.V. et al. Comprehensive assessment of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus drug susceptibility in vitro. *Antivir Ther* 15, 1151-9 (2010).

18. Moscona, A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med* 360, 953-6 (2009).

19. Hermesh, T., Moltedo, B., Lopez, C.B. & Moran, T.M. Buying time-the immune system determinants of the incubation period to respiratory viruses. *Viruses* 2, 2541-58 (2010).
20. Iwasaki, A. & Pillai, P.S. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 14, 315-28 (2014).
21. Pulendran, B. & Maddur, M.S. Innate immune sensing and response to influenza. *Curr Top Microbiol Immunol* 386, 23-71 (2015).
22. Baumgarth, N. How specific is too specific? B-cell responses to viral infections reveal the importance of breadth over depth. *Immunol Rev* 255, 82-94 (2013).
23. Chowell, G. et al. Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza. *N Engl J Med* 361, 674-9 (2009).
24. Echevarria-Zuno, S. et al. Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis. *Lancet* 374, 2072-9 (2009).
25. Presanis, A.M. et al. The severity of pandemic H1N1 influenza in the United States, April - July 2009. *PLoS Curr* 1, RRN1042 (2009).
26. Kumar, A. et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA* 302, 1872-9 (2009).
27. Zarychanski, R. et al. Correlates of severe disease in patients with 2009 pandemic influenza (H1N1) virus infection. *CMAJ* 182, 257-64 (2010).
28. Campbell, A. et al. Risk of severe outcomes among patients admitted to hospital with pandemic (H1N1) influenza. *CMAJ* 182, 349-55 (2010).
29. Louie, J.K. et al. Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. *JAMA* 302, 1896-902 (2009).
30. Keynan, Y., Malik, S. & Fowke, K.R. The role of polymorphisms in host immune genes in determining the severity of respiratory illness caused by pandemic H1N1 influenza. *Public Health Genomics* 16, 9-16 (2013).
31. Angulo, J. et al. Genetic variations in host IL28B links to the detection of peripheral blood mononuclear cells-associated hepatitis C virus RNA in chronically infected patients. *J Viral Hepat* 20, 263-72 (2013).
32. Angulo, J. et al. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in IL28B, but Not TNF-alpha, With Severity of Disease Caused by Andes Virus. *Clin Infect Dis* 61, e62-9 (2015).
33. Egli, A. et al. IL-28B is a key regulator of B- and T-cell vaccine responses against influenza. *PLoS Pathog* 10, e1004556 (2014).
34. Keynan, Y. et al. Chemokine receptor 5 big up tri, open32 allele in patients with severe pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis* 16, 1621-2 (2010).
35. La, D. et al. Enrichment of variations in KIR3DL1/S1 and KIR2DL2/L3 among H1N1/09 ICU patients: an exploratory study. *PLoS One* 6, e29200 (2011).
36. Zuniga, J. et al. Genetic variants associated with severe pneumonia in A/H1N1 influenza infection. *Eur Respir J* 39, 604-10 (2012).
37. Antonopoulou, A. et al. Role of tumor necrosis factor gene single nucleotide polymorphisms in the natural course of 2009 influenza A H1N1 virus infection. *Int J Infect Dis* 16, e204-8 (2012).
38. Brass, A.L. et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243-54 (2009).
39. Everitt, A.R. et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* 484, 519-23 (2012).
40. Yang, X. et al. Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Genetic Variant rs12252 and Influenza Susceptibility and Severity: A Meta-Analysis. *PLoS One* 10, e0124985 (2015).
41. Ciancanelli, M.J. et al. Infectious disease. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science* 348, 448-53 (2015).