



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**MÚLTIPLES CLADOS Y SUBCLADOS DE INFLUENZA A H3N2 EN  
PACIENTES AMBULATORIOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS A  
PRINCIPIOS DE 2018 EN MÉXICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ VICTOR ALBERTO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. SANTIAGO ÁVILA RIOS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**MÚLTIPLES CLADOS Y SUBCLADOS DE INFLUENZA A H3N2 EN  
PACIENTES AMBULATORIOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS A  
PRINCIPIOS DE 2018 EN MÉXICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ VICTOR ALBERTO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. SANTIAGO ÁVILA RIOS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, 2023**

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**OFICIO CPCB/151/2023**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de noviembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ VICTOR ALBERTO** con número de cuenta **302244243** con la tesis titulada **“MÚLTIPLES CLADOS Y SUBCLADOS DE INFLUENZA A H3N2 EN PACIENTES AMBULATORIOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS A PRINCIPIOS DE 2018 EN MÉXICO”**, realizada bajo la dirección del **DR. CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO  
Vocal: DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA  
Vocal: DR. LUIS PADILLA NORIEGA  
Vocal: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO  
Secretario: DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 03 de febrero de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos:**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Porque al finalizar el posgrado, me proporcionó las herramientas necesarias para ayudar a que México sea un mejor país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo con la beca de manutención (CVU 587984), para fortalecer mi formación científica.

A los miembros del Comité Tutor, Dr. Carlos Cabello Gutiérrez, Dr. Santiago Ávila Ríos y al Dr. Carlos Federico Arias Ortiz, por su apoyo académico, sus consejos, tiempo y esfuerzo para enriquecer mi trabajo durante el proyecto de investigación. En especial a mi tutor principal, le agradezco la confianza y la guía para hacer el trabajo en su grupo de investigación.

Agradezco todo el apoyo de mi esposa e hija, su paciencia y cuidados me permitieron complementar mi trabajo de investigación y llegar a ser una mejor persona y ser humano. ¡Gracias!

Abuelita siempre estarás en los momentos difíciles y en cada logro. Gracias por todas las cosas que me enseñaste. A mi mamá y a mi tía les agradezco sus consejos y su paciencia.

Aunque ya no estemos tan cerca, todo lo aprendido y saber que se puede contar con ustedes: Isaac, Reyna, Arturo, Antonia y Luis

A mis suegros Fernando y Silvia, les agradezco su confianza y su apoyo. A mí cuñada Araceli y a sus hijas por compartir su tiempo y compañía.

A todas las personas que voluntaria o involuntariamente contribuyeron al desarrollo de este trabajo y a l@s amig@s que están cerca o lejos, pero que compartieron momentos importantes: Roque, Román, Antonio, Daniel, Rogelio, Andy, Daniela, Carmen, Elvira, Loana, Amanda, Mariana, Laura y Janeth.

A los colegas que me han permitido crecer profesionalmente:  
Gabriel, Edith, Manuel, Lety, Dora, Carlitos, Jonie, Jaquie, Claudia,  
David y Rubén.

Finalmente, debo agradecer a todos los pacientes que me dieron  
su confianza para participar en mi proyecto de investigación.



Les dedico este trabajo a todas mis musas: mi hija,  
mi esposa,  
mi mamá  
mi tía,  
y a ti abue, descansa y trataré de cumplir mis metas, como tú me  
diste el ejemplo.

Son las más importantes para mí y espero que concluir con este  
trabajo recompense un poco de lo mucho que ustedes me dan cada día.

## Índice

Lista de figuras

Lista de tablas

Lista de abreviaturas

Resumen .....	1
Abstract.....	2
1.- Introducción .....	3
1.1.- Virus de influenza .....	3
1.2.- Estructura de los virus de Influenza.....	5
1.3.- Vías de infección.....	8
1.3.1.- Modo de transmisión del virus de influenza en humanos .....	8
1.3.2.- Contribución del medio ambiente en la infección de influenza .....	8
1.3.3.- Epidemiología de influenza en México durante la temporada de influenza 2017-2018 .....	9
1.3.4.- Los avances tecnológicos y su papel en la diseminación del virus de influenza	10
1.3.5.- Hospederos de influenza y las zoonosis .....	11
1.4.- Ciclo de replicación del virus de influenza.....	12
1.4.1.- Los receptores de la célula eucariota humana involucrados en la unión con el virus de influenza.....	12
1.4.2.- Hemaglutinina y la entrada del virus de influenza a la célula eucariota humana .....	14
1.4.3.- La endocitosis y el papel de los canales de protones de los virus de influenza..	15
1.4.4.- Transcripción y replicación del genoma viral de influenza.....	16
1.4.5.- Ensamblaje y gemación de la progenie viral de influenza .....	16
1.5.- Infección respiratoria aguda.....	18
1.5.1.- Infección respiratoria aguda por el virus de influenza .....	18
1.6.- Respuesta inmunológica frente al virus de influenza .....	20
1.6.1.- Inmunidad de la mucosa respiratoria.....	20
1.6.2.- Inmunidad innata .....	21
1.6.3.- Inmunidad adaptativa .....	23
1.6.4.- Inmunidad Humoral.....	24
1.6.5.- Células B y respuesta de anticuerpos .....	25
1.6.6.- Citotoxicidad de las células dependiente de anticuerpos (ADCC).....	27
1.7.- Impulsores evolutivos y origen de los virus de influenza.....	28
1.7.1.- Cambio antigénico.....	28

1.7.2.- Deriva antigénica.....	29
1.7.3.- Presión de selección por el hospedero.....	30
1.7.4.- Participación del medio ambiente en la evolución de los virus de influenza.....	33
1.7.5. Historia evolutiva de los virus de influenza.....	37
1.8.- Vacunas.....	45
1.8.1.- Historia de las vacunas .....	46
1.8.2.- Vacuna de influenza .....	47
1.8.3.- Efectividad de la vacuna de influenza .....	49
2.- Objetivos .....	50
3.- Antecedentes .....	51
4.- Metodología .....	53
4.1.- Participantes.....	53
4.2.- Diagnóstico de influenza.....	53
4.3.- Secuenciación de hemaglutinina.....	53
4.4.- Análisis filogenético .....	54
4.5.- Definición de vacunados, casos y controles. ....	55
4.6.- Análisis estadísticos.....	56
5.- Resultados .....	57
5.1.- Características de pacientes ambulatorios .....	57
5.2.- Efectividad de la vacuna contra la influenza .....	59
5.3.- Análisis genético del gen HA .....	62
5.4.- Variaciones en los residuos de aminoácidos de HA .....	64
6.- Discusión.....	65
7.- Conclusiones .....	69
8.- Referencias Bibliográficas .....	71
9.- Material suplementario. Figuras y tablas suplementarias .....	92
10.- Anexo. Artículo requisito para obtención de grado.....	103

## Lista de figuras

Figura 1.- Tomografía crioelectrónica del virus de influenza.....	5
Figura 2.- Virión de influenza A y B.....	7
Figura 3.- Distribución de los receptores de ácido siálico en el tracto respiratorio humano .....	13
Figura 4.- Ciclo de replicación del virus de influenza.....	17
Figura 5.- Respuesta inmune innata, adaptativa e inducción de la respuesta humoral.....	27
Figura 6.- Virus de influenza A(H3N2) representativos de las temporadas de influenza 2011-2017.....	45
Figura 7.- Árbol de máxima probabilidad basado en Hasegawa-Kisino-Yano para la hemaglutinina de influenza.....	63
Figura suplementaria 1a. Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del norte durante las temporadas de influenza 2016-2017.....	92
Figura suplementaria 1b. Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del norte durante las temporadas de influenza 2017-2018.....	93
Figura suplementaria 1c. Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del norte durante las temporadas de influenza 2018-2019.....	94
Figura suplementaria 1d. Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del norte durante las temporadas de influenza 2019-2020.....	95
Figura suplementaria 1e. Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del norte durante las temporadas de influenza 2020-2021.....	96
Figura suplementaria 1f. Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del norte durante las temporadas de influenza 2021-2022.....	97

## Lista de tablas

Tabla 1.- Características demográficas y clínicas de casos y controles.....	58
Tabla 2.- Efectividad de la vacuna en pacientes ambulatorios a principios de 2018.....	59
Tabla 3.- Variables asociadas con influenza.....	61
Tabla 4.- Influenza A(H3N2) asociada con todos los tipos y subtipos de Influenza.....	61
Tabla suplementaria 1.- Números absolutos de casos y controles por tipo o subtipo de influenza.....	98
Tabla suplementaria 2.- Estimados de la efectividad de la vacuna por tipo o subtipo de influenza.....	99
Tabla suplementaria 3.- Números absolutos de casos y controles por clados o subclados de influenza A(H3N2).....	100
Tabla suplementaria 4.- Estimados de efectividad de la vacuna para clados o subclados de influenza A(H3N2).....	101
Tabla suplementaria 5.- Análisis de la sustitución de aminoácidos en el virus A(H3N2) aislados de pacientes mexicanos comparados con el virus A/Hong Kong/4801/2014.....	102

## Lista de abreviaturas

EV	Efectividad de la vacuna
RIDT	prueba de diagnóstico rápido de influenza (por sus siglas en ingles)
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retro-transcripción y en tiempo real
HA	Hemaglutinina
NA	Neuraminidasa
RNA	Ácido desoxirribonucleico
nm	Nanómetros
µm	Micrómetro
vRNPs	ribonucleoproteínas virales
RdRp	RNA polimerasas dependientes de RNA viral
M2	proteínas transmembranales homotetraméricas o canales de protones
HE	hemaglutinina esterasa
HEF	proteína de fusión hemaglutinina-esterasa
NEP	proteínas de exportación nuclear
PB1	polimerasas básicas 1
NS1	proteínas no estructurales
HA1	dominio HA1 de la hemaglutinina
HA2	dominio HA2 de la hemaglutinina
IRA	infección respiratoria aguda
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
PRR	receptores de reconocimiento de patógenos (por sus siglas en ingles)
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en ingles)
TLR	receptores tipo Toll (por sus siglas en ingles)
NLR	receptores tipo NOD (por sus siglas en ingles)
INF	Interferón
ISG	genes estimulados por interferón (por sus siglas en ingles)
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en ingles)
NK	células asesinas naturales (por sus siglas en ingles)
DC	células dendríticas (por sus siglas en ingles)
CTL	linfocitos T citotóxicos (por sus siglas en ingles)
ADCML	complemento dependiente de anticuerpos (por sus siglas en ingles)
APC	células presentadoras de antígenos (por sus siglas en ingles)
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad (por sus siglas en ingles)
ASC	células plasmáticas secretoras de anticuerpos (por sus siglas en ingles)
ADCC	Citotoxicidad de las células dependiente de anticuerpos (por sus siglas en ingles)
UV	Ultravioleta
a. C.	antes de Cristo
HLA	antígenos leucocitarios humanos (por sus siglas en ingles)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ESI	enfermedad similar a influenza
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”
Pb	pares de bases

## **Resumen**

### **Antecedentes**

La evolución de los virus de la influenza provoca una disminución en la efectividad de la vacuna (EV), lo que obliga a monitorear constantemente las mutaciones y a reajustar la composición recomendada de las vacunas contra los virus de influenza. Se evaluó la EV y las mutaciones de los virus presentes en la población mexicana a principios de 2018.

### **Métodos**

Diagnosticamos influenza en pacientes ambulatorios con una prueba de diagnóstico rápido de influenza (RIDT) de alto rendimiento y qRT-PCR. Se utilizó estadística descriptiva para caracterizar la población de estudio, se estimaron algunas variables clínicas aplicando la prueba  $\chi^2$ . Utilizando un diseño de prueba negativa se analizó la EV. Se secuenció el gen de la hemaglutinina (HA), se realizó un análisis filogenético y se analizaron las sustituciones no sinónimas dentro y fuera de los sitios antigénicos.

### **Resultados**

De los 240 pacientes analizados, el 42.5% recibió la vacuna trivalente y el 37.5% fueron positivos para influenza. La EV para la población general para cualquier tipo o subtipo del virus de influenza fue del 37 %, mientras que la EV para el subtipo de influenza A(H3N2) fue la más baja (19.7 %). El análisis filogenético de HA mostró la co-circulación de clados y subclados 3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2, 3C.2a2re, 3C.2a3 y 3C.3a con identidades de aproximadamente 97%-98% similares a la composición de la vacuna.

### **Conclusiones**

La baja EV estaba relacionada con la co-circulación de múltiples clados y subclados de influenza A(H3N2), con suficiente distancia genética y fenotípica para permitir la infección de individuos vacunados.

## **Abstract**

### **Background**

The evolution of influenza viruses causes a decrease in vaccine effectiveness (VE), requiring the constant monitoring of mutations and readjustments to the recommended composition of influenza vaccines against the influenza virus. We evaluated the VE and the mutations of the viruses present in the Mexican population at the beginning of 2018.

### **Methods**

We diagnosed influenza in outpatients with high-performance Rapid Influenza Diagnostic Test (RIDT) and qRT-PCR. Descriptive statistics were used to describe the study population, while a  $\chi^2$  was used to determine clinical variables. VE was analyzed through a negative test design. We sequenced the hemagglutinin (HA) gene, performed a phylogenetic analysis and analyzed the nonsynonymous substitutions both in-side and outside antigenic sites.

### **Results**

Of the 240 patients analyzed, 42.5% individuals received the trivalent vaccine, and 37.5% were positive for influenza. The VE for the general population for any influenza virus type or subtype was 37.0%, while the VE for the predominant influenza A(H3N2) subtype was the lowest (19.7%). The phylogenetic analysis of HA showed the co-circulation of clades and subclades 3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2, 3C.2a2re, 3C.2a3, and 3C.3a with identities of approximately 97%-98% similar to the vaccine composition.

### **Conclusions**

Low VE was related to the co-circulation of multiple clades and subclades of influenza A(H3N2), with sufficient genetic and phenotypic distance to allow for the infection of vaccinated individuals.



## 1.- Introducción

### 1.1.- Virus de influenza

Los virus de influenza están clasificados dentro de la familia *Orthomyxoviridae* que consta de siete géneros (Arias et al., 2009; Dou et al., 2018; Ferhadian et al., 2018). Los géneros *Alphainfluenzavirus* y *Betainfluenzavirus* representan la mayor amenaza de salud pública, porque constituyen a las dos principales especies de influenza que circulan en humanos, causantes de pandemias y epidemias: influenza A e influenza B (Asha & Kumar, 2019; Ferhadian et al., 2018).

Los virus de influenza A y B se clasifican y se han nombrado por su orden de descubrimiento, por sus diferencias genéticas y antigénicas. Los virus más antiguos que se han logrado estudiar, los virus de la influenza española de 1918, se les nombro como virus de influenza tipo A (Anhlan et al., 2011; Bouvier & Palese, 2008; Fouchier et al., 2005). El origen de los subtipos de influenza A se da cuando en 1957 aparece entre la población un virus de influenza con mayor homología genética con influenza A que con influenza B y antigénicamente distintos a influenza A por su hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), con esta información se clasificó al primer virus de influenza española, como el virus de influenza A subtipo H1N1 y el descubierto en 1957 como el virus de influenza A subtipo H2N2, con este mismo sistema se comenzaron a asignar números a todos los demás virus conforme se fueron aislando en mamíferos y aves, con homología con influenza A, pero antigénicamente distintos por su HA y NA. Hasta la fecha se han encontrado 18 HA y 11 NA en aves y mamíferos (Scholtissek et al., 1978; Wille & Holmes, 2020).

Además de diferenciar a los virus de influenza A en subtipos, con la ayuda de las técnicas de reacción antígeno anticuerpo, actualmente los trabajos con anticuerpos monoclonales y estructuras de proteínas, permiten identificar cinco sitios antigénicos dentro de la HA ampliamente definidos para los subtipos H1N1 y H3N2 que son: Sa, Sb, Ca1, Ca2, Cb y A, B, C, D, E respectivamente (Allen & Ross, 2018; Bouvier & Palese, 2008; Petrova & Russell, 2018b). Cambios entre 1 a 3 aminoácidos dentro de estos sitios antigénicos junto con las pruebas neutralización que corroboran las distancias antigénicas entre los virus, permiten dividir a un subtipo en clados. Entre 2009 y 2018, se clasificaron los siguientes clados para el subtipo H1N1: 6A, 6B, 6C y del 6B divergen a su vez los clados 6B.1, 6B.1A y 6B.2 (Petrova & Russell, 2018b; Zhao et al., 2020). Para el subtipo H3N2 los clados de 2011 a 2018 son: 3C, y de este divergen los caldos 3C.1, 3C.2, 3C.3, a su vez, del clado 3C.2 divergen los clados 3C.2a, 3C.2a1 y 3C.2b, y del clado 3C.3 divergen los clados 3C.3a y 3C.3b (Jorquera et al., 2019).

Para clasificar a los virus de influenza B, varios autores coinciden que desde la década de 1940 estos virus circularon entre individuos vacunados a influenza A, al estudiar dichos virus confirmaron su distancia genética y antigénica con respecto a influenza A y fue hasta 1988 que los cambios de aminoácidos en la HA de los virus de influenza B, llevaron a que se clasificaran en dos linajes: Victoria y Yamagata. Estos virus co-circularon hasta la pandemia por SARS-Cov2 (Petrova & Russell, 2018a; York et al., 2019).

Dentro de los géneros *Gammainfluenzavirus* y *Deltainfluenzavirus*, se clasifican a las especies de virus de influenza C y D respectivamente, y aunque comparten una ascendencia en común con los virus de la influenza A y B, son genética y antigénicamente distintos

(Ferhadian et al., 2018). Los virus de influenza C se detectaron por primera vez en 1947 en niños, que les provocó enfermedad respiratoria leve, al observar su información genética y corroborar su distancia antigénica con los virus de influenza A y B, se les decide nombrar virus de influenza C (Asha & Kumar, 2019; Ferhadian et al., 2018; York et al., 2019). En 2011 se concluye nombrar a los virus de influenza aislados en ganado vacuno y cerdos, como virus de influenza D por su distancia genética y antigénica con respecto a los virus de influenza A, B y C (Asha & Kumar, 2019).

El resto de los géneros dentro de la familia *Orthomyxoviridae* están restringidos a la infección de peces, artrópodos, insectos y aves (Ferhadian et al., 2018).

## 1.2.- Estructura de los virus de Influenza

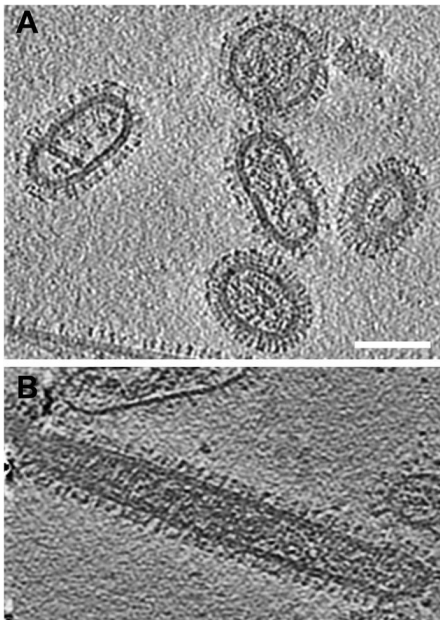


Figura 1. Tomografía crioelectrónica del virus de influenza A pandémico H1N1 2009 (rodajas tomográficas de ~5nm de espesor). Muestra el interior de viriones de influenza de forma esférica (A) y un virión filamentosamente largo (B). Tomado y modificado de (Harris et al., 2013)

Los virus de influenza observados bajo el microscopio electrónico tienen una apariencia pleomórfica (**figura 1**), la partícula viral típicamente esférica tiene un diámetro promedio

de 100 millonésimas de milímetros o nanómetros (nm) y en su forma alargada puede alcanzar alrededor de 300 nm de longitud (Arias et al., 2009; Harris et al., 2013). La **figura 2** representa un virus de influenza, su primer característica es ser virus envueltos, es decir, tienen una membrana procedente de las células del hospedero que recubren las proteínas de la matriz (M1) y estas a su vez recubren las ribonucleoproteínas virales (vRNPs) y las RNA polimerasas dependientes de RNA viral (RdRp) (Ferhadian et al., 2018; Harris et al., 2013; X. Li et al., 2021). Todos los tipos de virus de influenza poseen un genoma de RNA segmentado, monocatenario de sentido negativo. Sin embargo, los tipos de influenza A y B tienen 8 segmentos del genoma que codifican para 11 proteínas, mientras que los virus de los tipo C y D sólo tienen 7 segmentos del genoma que codifican para 9 proteínas (Asha & Kumar, 2019; Ferhadian et al., 2018; X. Li et al., 2021). Los genomas segmentados están asociados a múltiples copias de nucleoproteínas (NP) y tres subunidades de RNA polimerasa viral para formar los complejos de vRNPs (Ferhadian et al., 2018; X. Li et al., 2021).

Otra característica de los virus de influenza A y B son las proteínas transmembranales homotetraméricas o canales de protones (M2) y dos glicoproteínas la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) que se encuentran insertadas en la membrana procedente del hospedero (Arias et al., 2009; Petrova & Russell, 2018a). Para el caso de los virus de influenza C y D también tienen proteínas insertadas en la membrana del hospedero, la M2 y en lugar de HA y NA tiene una sola glicoproteína, la proteína de fusión hemaglutinina-esterasa (HEF) que cumple las funciones de ambas glicoproteínas (Halldorsson et al., 2021; Su et al., 2017).

Las proteínas de exportación nuclear (NEP), las polimerasas básicas 1 (PB1) y las no estructurales 1 (NS1) no conforman una parte estructural de los viriones maduros, pero son proteínas que tienen un papel fundamental en la exportación nuclear de los complejos vRNPs al interior del núcleo de la célula, en la inducción de la muerte celular por apoptosis, y como antagonistas de la respuesta de interferón que le permite evadir la respuesta inmunológica (Arias et al., 2009; Petrova & Russell, 2018a).

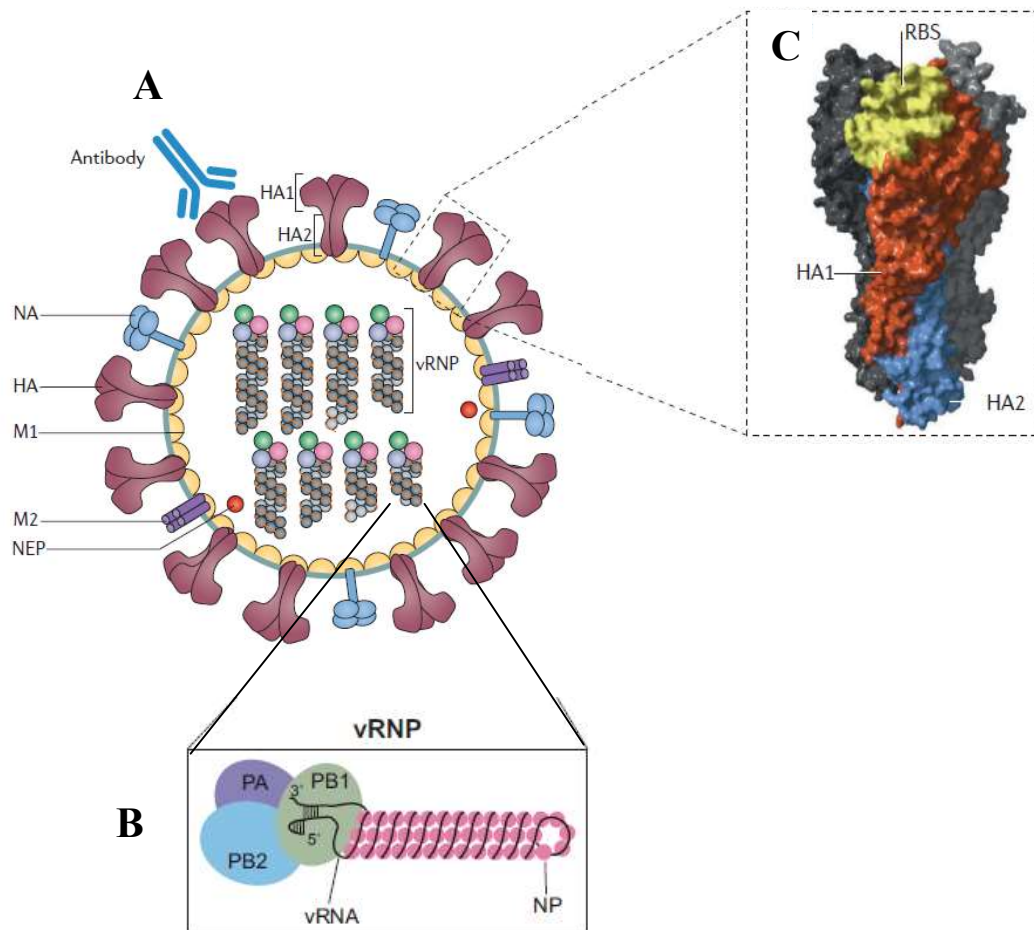


Figura 2.- Virión de influenza A y B. Principales proteínas de superficie HA (rojo), NA (azul) y M2 (morado) (A). Complejo vRNP de los 8 segmentos del genoma viral (B). HA resaltando los dominios HA1 (anaranjado), HA2 (azul) y el sitio de unión al receptor (amarillo) (C). Tomado y modificado de (Dou et al., 2018; Petrova & Russell, 2018b)

### **1.3.- Vías de infección**

#### **1.3.1.- Modo de transmisión del virus de influenza en humanos**

Los virus se diseminan entre los seres humanos por contacto directo o indirecto con las gotas o aerosoles que contienen partículas virales, formadas por las personas infectadas al toser, estornudar y/o hablar (Dhand & Li, 2020; Pan & Lednicky, 2019; Tellier et al., 2019). La tos y estornudos son la forma más eficiente de transmisión de los virus de influenza debido a que se expulsan entre 3 000 a 40 000 gotitas con moco y secreciones conteniendo partículas virales. Además los aerosoles de alrededor de 0.6-4  $\mu\text{m}$  pueden permanecer suspendidas en las corrientes de aire y penetrar hasta los alveolos, las partículas entre 4-5  $\mu\text{m}$  se depositan principalmente en vías respiratorias bronquiales y conductoras, mientras que las partículas de mayor tamaño son atrapadas por el epitelio ciliar en movimiento, y la secreción de la mucosa nasal, llevándolas hacia la garganta para ser tragadas (Dhand & Li, 2020; Pan & Lednicky, 2019; Tellier et al., 2019).

#### **1.3.2.- Contribución del medio ambiente en la infección de influenza**

Se ha probado que la infección por influenza entre mamíferos es más eficiente a temperatura de 5°C y humedades relativas del 20%, estas condiciones climáticas se dan cada año durante el invierno en países de clima templado (Gomez-Barroso et al., 2017; Lowen et al., 2007). La transmisión de la enfermedad entre humanos, comienza a elevarse durante los meses más fríos, de octubre a marzo en el hemisferio norte y en el hemisferio sur entre los meses de mayo a septiembre (Gomez-Barroso et al., 2017; Lowen et al., 2007). Se propone que lo anterior ocurre debido a la estabilidad de las partículas de agua que

contienen virus, a la baja humedad y temperatura, lo que les confiere a estas partículas la cualidad de ser más ligeras y quedarse en el aire por periodos más prolongados, aumentando la probabilidad de aspirarlas e infectarse (Gomez-Barroso et al., 2017; Lowen et al., 2007).

A diferencia del hemisferio norte y sur que tienen estaciones invernales, los países tropicales y subtropicales realmente no cursan por una estación invernal, en consecuencia, la humedad y la lluvia se relacionan directamente con el aumento en la incidencia de las infecciones, que se extiende hasta en dos periodos por año, entre febrero a marzo y de junio a julio (Monamele et al., 2017; Soebiyanto et al., 2015). Inclusive en algunos países tropicales y subtropicales se registran casos de influenza prácticamente todo el año (Monamele et al., 2017).

### **1.3.3.- Epidemiología de influenza en México durante la temporada de influenza 2017-2018**

En México en los estados del centro y norte del país hay climas templados y áridos respectivamente, en estos lugares durante 2018 se observó una temporada de influenza que fue desde octubre de 2017 hasta mayo de 2018, con predominio de influenza A(H3N2) coincidiendo con los reportes del hemisferio norte (DGE, 2017, 2018). En el territorio mexicano también hay regiones tropicales al suroeste del país como Yucatán, donde se presentó un brote con alta incidencia de influenza A(H1N1) de mayo a septiembre de 2018, que es muy particular, debido a que la incidencia de influenza se comportó como en el hemisferio sur, coincidiendo con los reportes de Chile, Australia y Brasil, inclusive hay un estudio que muestra este mismo comportamiento en Yucatán desde las temporadas de

influenza de 1998 hasta 2014 (Ayora-Talavera et al., 2017). Esto nos lleva a que en México se deben replantear las fechas de aplicación de la vacunación y ajustar los planes de respuesta en salud pública por regiones del territorio nacional.

La temporada de influenza en México durante 2018 se caracterizó por la circulación de diferentes subtipos de influenza, predominando en distintas partes del país y en diferentes momentos del año, a esos fenómenos de aumento de casos de forma local se le denomina epidemia. Mientras que las pandemias son una distribución mundial de un patógeno que causa una enfermedad, como sucedió con el virus de influenza AH1N1 2009 que causó la primer pandemia del siglo XXI (Ayora-Talavera, 2018; DGE, 2017, 2018; Saunders-Hastings & Krewski, 2016).

#### **1.3.4.- Los avances tecnológicos y su papel en la diseminación del virus de influenza**

La diseminación local y mundial de la influenza entre humanos tiene una correlación con el desarrollo tecnológico de varios medios de transporte como el ferrocarril, barcos, aviones, así como el surgimiento de rutas de comercio y la movilidad de la población, por ejemplo, la movilización de los ejércitos al final de la primera guerra mundial y durante el regreso de las tropas de Vietnam a los Estados Unidos de América coinciden con las pandemias de 1918 y 1968 (Saunders-Hastings & Krewski, 2016). Durante la última pandemia de influenza en 2009 se ha estudiado la movilidad del virus con respecto a los viajeros turísticos, de negocios y las migraciones, mostrando que los migrantes que pasan a través de México hacia E.U.A. tienen tasas de vacunación bajas y exponen a las poblaciones a donde llegan, con virus que podrían no estar circulando en esos lugares



(Belderok et al., 2013; Goeijenbier et al., 2017; Lawyer, 2016; Wilcox & Hirshkowitz, 2015). La ubicación del brote de la enfermedad y el acceso que tenga la población enferma a los aeropuertos y viajes internacionales, influye de manera importante en la diseminación de la enfermedad (Lawyer, 2016). Finalmente los individuos que viajan a zonas tropicales, tienen alto riesgo de contraer influenza, debido a que en estos lugares los virus de influenza pueden circular todo el año (Belderok et al., 2013).

### **1.3.5.- Hospederos de influenza y las zoonosis**

Otro aspecto importante a considerar en las vías de infección, es la amplia gama de hospederos no humanos que pueden infectarse con los virus de influenza (Air & Compans, 1983; Bodewes et al., 2013; Parrish et al., 2015). Influenza A se encuentra distribuida en aves silvestres, domésticas y diversos mamíferos como los humanos, cerdos, focas, ballenas, visones, caballos, perros, gatos, hurones y murciélagos (Parrish et al., 2015; Russell et al., 2018). Influenza B se ha encontrado en humanos y focas (Bodewes et al., 2013; Ferhadian et al., 2018). Influenza C se ha aislado en humanos, cerdos, caballos y experimentalmente en hurones (Air & Compans, 1983). Influenza D se ha aislado en ganado bovino y cerdos, y aunque se propone que deriva de humanos no se ha aislado en éste (Ferhadian et al., 2018; Su et al., 2017). La distribución de la enfermedad en diversos mamíferos y aves silvestres, le proporciona al virus la movilidad entre países y continentes, debido a las rutas migratorias de las aves y al comercio de aves y cerdos (Parrish et al., 2015). El comercio de animales silvestres y de corral en mercados ha sido un foco de atención de las autoridades sanitarias locales y globales, y por esta razón desde hace años en China se monitorean los virus de influenza en las personas que están en estrecho

contacto con aves y cerdos en dichos mercados (Widdowson et al., 2017; Woo et al., 2006). Este último aspecto en las vías de transmisión, hace necesario más investigaciones y leyes a nivel global que minimicen la zoonosis de las enfermedades, con un monitoreo más extenso en búsqueda de virus en animales, evitando la invasión y pérdida de hábitats, así como castigos más severos a traficantes de especies silvestres.

#### **1.4.- Ciclo de replicación del virus de influenza**

##### **1.4.1.- Los receptores de la célula eucariota humana involucrados en la unión con el virus de influenza**

Para que los virus de influenza infecten a su hospedero, necesitan de receptores en la célula para poder unirse e ingresar a su interior. Algunas células de mamíferos tienen un recubrimiento de glicanos como N-glicanos, O-glicanos y algunos de ellos tienen una terminación en galactosa unida a ácidos siálicos. En humanos el principal ácido siálico es el N-acetilneuraminico, estos están conectados mediante un enlace glicosídico  $\alpha$  2,3 o  $\alpha$  2,6 (Arias et al., 2009; Lazniewski et al., 2018). Las células epiteliales que recubren las vías respiratorias altas de humano tienen principalmente carbohidratos con enlace  $\alpha$  2,6 como se muestra en la **figura 3**, mientras que las células epiteliales del intestino de aves acuáticas tienen principalmente el enlace en  $\alpha$  2,3. (Arias et al., 2009; Krammer et al., 2018; Nachbagauer & Krammer, 2018; Shinya, K., Ebina, M., Yamada, 2006). La disposición de los receptores glicosídicos en enlace  $\alpha$  2,3 o  $\alpha$  2,6 en distintas partes anatómicas de los distintos hospederos y su abundancia, explica parcialmente las zoonosis, por ejemplo, en los casos H7N9 y H5N1 en humanos (Long et al., 2019).

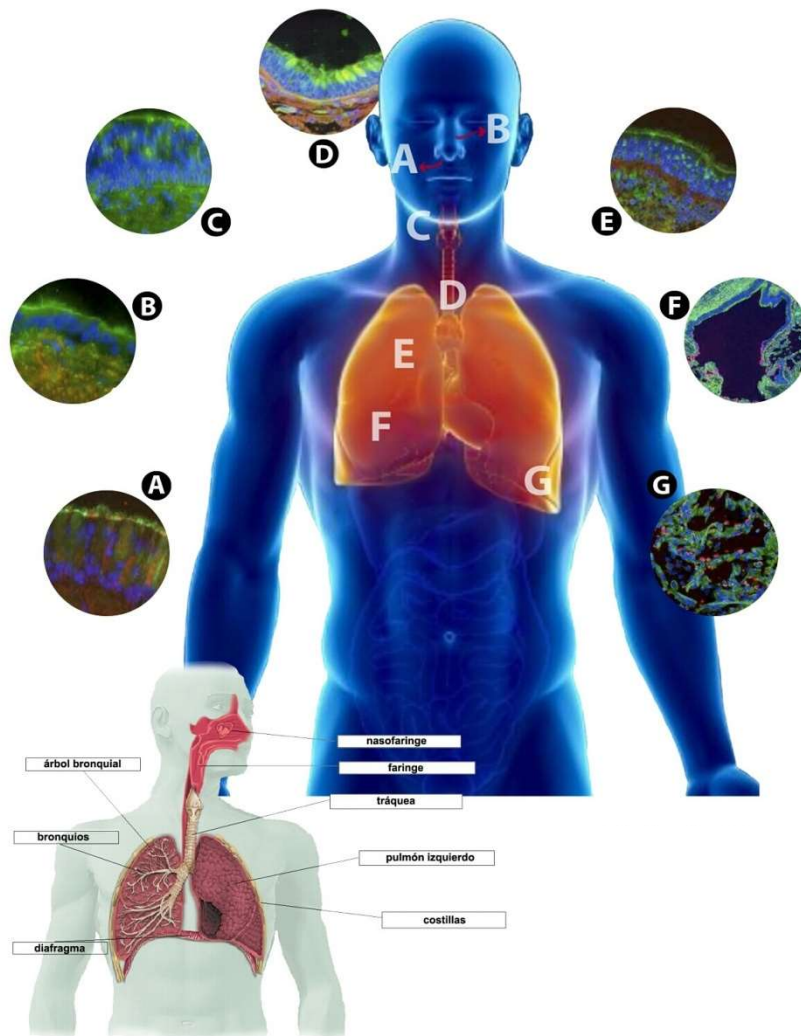


Figura 3.- Reactividad de la lectina *Sacubus nigra* (verde) indica la presencia de ácidos sálicos  $\alpha$  2,6 y la lectina *Ameurensis maackia* (rojo) indica la presencia de ácidos sálicos  $\alpha$  2,3, para el contraste de las células se utilizó DAPI. Se muestra la reactividad de los tejidos humanos respiratorios con lectinas en A) Mucosa nasal, B) Senos paranasales, C) Faringe, D) Tráquea, E) Bronquios, F) Bronquiolos y G) Alvéolos. Tomado y modificado de (Shinya, K., Ebina, M., Yamada, 2006).

#### **1.4-2.- Hemaglutinina y la entrada del virus de influenza a la célula eucariota humana**

Los virus de influenza A y B tienen la HA que permite la unión virus-células, esta proteína tiene una abundancia relativa de 400 homotrimeros por virión, que es la abundancia más alta entre las proteínas de superficie del virus, esta cantidad aumenta las posibilidades de unión virus-célula, **figura 4a** (Altman et al., 2018a; Hutchinson et al., 2015). La HA es una glicoproteína de membrana que se pliega como un trímero de subunidades idénticas que están formadas por una proteína precursora HA0 que es escindida por proteasas. Aunque se ha demostrado la replicación sin presencia de proteasas, experimentalmente la adición de tripsina o plasmina aumenta significativamente la infectividad del virus (Benton et al., 2018; Chaipan et al., 2009; LeBouder et al., 2010).

La HA0 no escindida no se fusiona con la membrana de la célula, pero un cambio de HA0 debido a la acción proteolítica de las proteasas presentes en el tracto respiratorio de un hospedero humano (proteasa humana, TMPRRS2) promueve la actividad fusogénica del virus con la célula (Benton et al., 2018; Dyer & Eller, 2018). Una vez hecha la activación de HA0 una serie de reacciones de repliegue suceden en el contexto de un pH más bajo, donde se disocia un subdominio de HA1 unido por un puente disulfuro a HA2 y se provoca el re-plegamiento de este último, que en consecuencia provoca la fusión de las membranas viral y de la célula, esta unión además induce la endocitosis y la internalización del virus. Este mecanismo de fusión de membrana mediada por hemaglutinina denominada “cargado por resorte” es uno de los más aceptado hasta el momento aunque sigue siendo hipotético (Dyer & Eller, 2018).

Un estudio muestra una alternativa a la entrada del virus por endocitosis, demostrando que la HA del virus al unirse a ácidos siálicos que a su vez están unidos a canales de calcio, dichos canales de calcio dependientes de voltaje (Cav 1.2) muestran oscilaciones inducidos por la unión HA con ácido siálico. Aunque este estudio es el inicio de un tema de investigación que puede contribuir a un mejor entendimiento de la entrada de los virus a las células, aún deja pendiente dilucidar la contribución de los canales de calcio en la diseminación de los virus al epitelio respiratorio y abren la oportunidad de estudiar otros canales sializados y su posible función en la infección (Fujioka et al., 2018).

#### **1.4.3- La endocitosis y el papel de los canales de protones de los virus de influenza**

Los canales de protones de los virus de influenza (M2) son la proteína de menor abundancia entre las proteínas de superficie (4 o 5 proteínas por virión), pero tiene un papel crucial por formar canales selectivos de protones que sirven para acidificar los virus y a los endosomas que contienen a los virus y liberar los ácidos nucleicos virales al interior de la célula (Altman et al., 2018a; Pielak & Chou, 2011). Después de la unión y fusión del virus con la célula, sigue la endocitosis mediada por clatrina e independiente de clatrina (S. Li et al., 2014). En los endosomas tempranos (**figura 4b**) hay un ambiente de pH entre 6 a 6.5 y altas concentraciones de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que activan el canal M2, promoviendo el flujo de protones y la salida de iones  $\text{K}^+$  del núcleo del virus (Cady, Sarah D; Lou, Wenbin; Hu, Fanghao; Hong, 2010; Manzoor et al., 2017). Al madurar los endosomas, el virus se expone a pH entre 5.4 a 6, una baja en la concentración de  $\text{Na}^+$  y una alta concentración de  $\text{K}^+$ , sólo en este entorno del endosoma tardío (**figura 4c**) se promueve la entrada de  $\text{K}^+$  y esto favorece dos cambios cruciales en la envoltura viral y la fusión con la membrana del

endosoma, esto mediado al mismo tiempo por un cambio conformacional en la HA (Alvarado-Facundo et al., 2015; Cady, Sarah D; Lou, Wenbin; Hu, Fanghao; Hong, 2010; Manzoor et al., 2017; Stauffer et al., 2014). Al final, el endosoma tardío libera los complejos de vRNPs y RdRps al citoplasma (Manzoor et al., 2017).

#### **1.4.4.- Transcripción y replicación del genoma viral de influenza**

Una vez en el citoplasma los complejos de vRNPs y RdRps son transportados al núcleo de la célula (**figura 4d**) para llevar a cabo la transcripción y replicación del genoma viral y dar origen a una nueva progenie. Las nuevas proteínas sintetizadas pasan por el retículo endoplasmático, complejo de Golgi y finalmente transportado por vesículas llega a la membrana celular donde se ensamblan los viriones (**figura 4e**). (Batishchev et al., 2016; Zhu et al., 2017). Durante la síntesis y transporte de las nuevas proteínas virales, M2 actúa en tres procesos: En su paso en el trans-Golgi el bajo pH activa a M2, que a su vez equilibra el pH entre el tras-Golgi y el citoplasma para evitar el cambio conformacional prematuro de HA. Otra acción de M2 es impedir la fusión de lisosomas y en consecuencia frena la degradación de las proteínas virales recién formadas. Finalmente M2 actúa junto con balsas lipídicas para estabilizar la gemación de la progenie viral (Batishchev et al., 2016; Martyna & Rossman, 2014; Wohlgemuth et al., 2018; Zhu et al., 2017).

#### **1.4.5.- Ensamblaje y gemación de la progenie viral de influenza**

Durante la agrupación de las proteínas virales en la membrana de la célula infectada para ensamblar a los nuevos viriones, M2 se localiza en la periferia junto con balsas lipídicas y la proteína de aglomeración molecular, la concentración de estas distintas proteínas permite

que M2 se inserte profundamente en la membrana de la célula y la altere, curvándola de tal forma que se forma un cuello que se va constriñendo (**figura 4f**) (Martyna & Rossman, 2014; Rossmann & Lamb, 2011). Durante la constricción de la membrana de la célula, el paso final para liberar a la nueva progenie viral, se requiere de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de los ácidos siálicos presentes en los sitios de gemación por acción de la NA (**figura 4g**), esto evita la unión entre la HA con los ácidos siálicos, liberando finalmente a los viriones. Esta nueva progenie viral puede seguir infectando a las células contiguas al sitio de la gemación (da Silva et al., 2015). A pesar de tener una participación crucial en la liberación de los nuevos viriones, la abundancia de la NA es 10 veces menor que la HA, es decir, su abundancia relativa por virión es de 40 glucoproteínas homotetraméricas (Altman et al., 2018a).

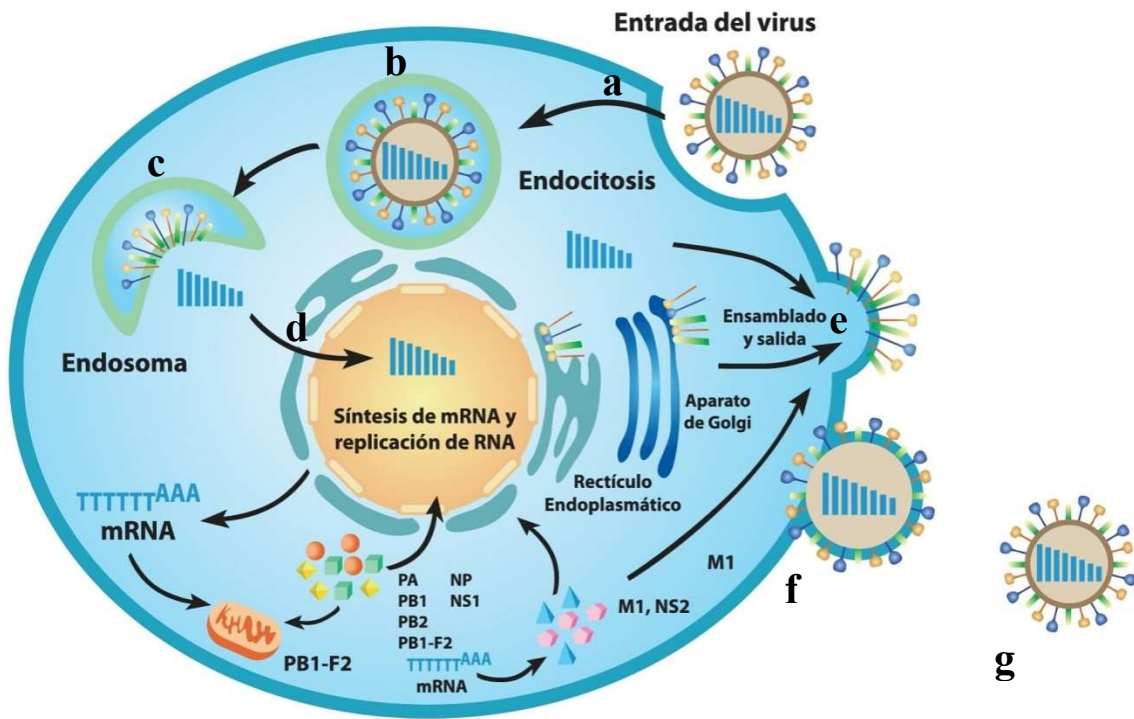


Figura 4.- Ciclo de replicación del virus de influenza, tomado y modificado de (Arias et al., 2009). (a) Unión virus-célula, (b) endosoma, (c) liberación de los complejos vRNPs y RdRps, (d) transporte de los complejos vRNPs y RdRps al núcleo de la célula, (e) ensamble de viriones, (f) constricción de la membrana celular y (g) gemación de la progenie viral.

## **1.5.- Infección respiratoria aguda**

La infección respiratoria aguda (IRA) es una enfermedad recurrente a lo largo de la vida del ser humano y su duración es menor a 15 días en promedio, este tiempo varía dependiendo del agente etiológico responsable de la infección y del estado inmunológico del individuo infectado (CDC, 2019a; Eiros et al., 2009; Khardori, 2010).

### **1.5.1.- Infección respiratoria aguda por el virus de influenza**

La IRA originada por el virus de influenza puede afectar cualquier parte del tracto respiratorio y causa síntomas de forma abrupta, coincidiendo con la producción de las citocinas (Bian et al., 2014; CDC, 2019a; Khardori, 2010). Tanto los virus estacionales como los virus pandémicos están asociados a la tos seca, dolor de garganta, fiebre mayor a 38°C, cefalea que puede llegar a ser intensa, mialgias, fatiga, disnea, taquipnea, dolor de pecho, hemoptisis o esputo purulento, fiebre recurrente o prolongada, deshidratación y en algunos casos se presentan síntomas gastrointestinales como náusea, vómito y diarrea (CDC, 2019a; Khardori, 2010; Rogelio Perez-Padilla, M.D., Daniela de la Rosa-Zamboni et al., 2009). Cuando no hay complicaciones de la enfermedad, los signos y síntomas desaparecen alrededor de los 3 a 7 días, coincidiendo con la disminución de la producción



de citocinas, aunque puede haber persistencia de tos y sensación de malestar hasta por más de dos semanas (Bian et al., 2014; CDC, 2021a).

Aunque se llega a definir como resfriado común a algunas IRAs por no causar una enfermedad grave, ciertas personas son especialmente susceptibles a padecer complicaciones y desencadenar una enfermedad grave o incluso la muerte. Las epidemias anuales por influenza afecta más a niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años, pero durante las pandemias también se ven afectados grupos de edad entre los 5 a 59 años, y ya sea en epidemias o pandemias por influenza, los individuos con comorbilidades subyacentes son particularmente vulnerables como los diabéticos, pacientes con falla de órganos pulmonar o cardíaco, personas inmunocomprometidas, pacientes obesos y mujeres embarazadas (CDC, 2021a; Khardori, 2010; Memoli et al., 2014; Rogelio Perez-Padilla, M.D., Daniela de la Rosa-Zamboni et al., 2009). Las principales complicaciones graves son bronquitis hemorrágica, neumonía por influenza que es poco común o neumonía bacteriana secundaria, estos síndromes clínicos llevan a hospitalización y unidad de cuidados intensivos por provocar la neumonitis viral difusa con hipoxemia severa, el síndrome de dificultad aguda respiratoria y algunas veces choque y falla renal, progresando rápidamente alrededor de los 4 a 5 días de haber iniciado los síntomas y que pueden desencadenar en la muerte (CDC, 2021a; Eiros et al., 2009; Khardori, 2010; Memoli et al., 2014; Rogelio Perez-Padilla, M.D., Daniela de la Rosa-Zamboni et al., 2009).

## **1.6.- Respuesta inmunológica frente al virus de influenza**

### **1.6.1.- Inmunidad de la mucosa respiratoria**

Las células epiteliales respiratorias expresan de manera constitutiva mucina, principal componente de la mucosa y funciona como una de las primeras barreras de defensa para combatir la infección de los virus de influenza, debido a que en su composición tienen receptores de ácido siálico que se unen a los virus, estos quedan atrapados y posteriormente son expulsados en las secreciones respiratorias (Chen, 2018; X. Yang et al., 2014). Sin embargo, la NA tiene su acción sialidasa que le permite hidrolizar los enlaces glicosídicos y así superar la mucosa para llegar a los epitelios respiratorios (**figura 5-A**) (X. Yang et al., 2014). La importancia de la NA en la unión virus-célula, se ha demostrado al agregar oseltamivir a cultivos de epitelio humano e inhibir eficazmente la infección, o que el uso de zanamivir suprime significativamente la liberación de los virus de la red del moco (Matrosovich et al., 2004; X. Yang et al., 2014). Estos trabajos abren la oportunidad de evaluar con mayor detalle la actividad sialidasa de la neuraminidasa viral y el impacto de las neuraminidasas bacterianas en la entrada y transmisión de los virus, así como probar la acción profiláctica de los medicamentos mencionados (Matrosovich et al., 2004; X. Yang et al., 2014).

Otro de los componentes de las mucosas son los anticuerpos o inmunoglobulinas A (IgA), aunque todavía no abordamos a detalle la interacción de los virus con el sistema inmunológico, adelantamos uno de los resultados de la activación del sistema inmune, y es que las IgA se producen a partir de las células plasmáticas secretoras (Staneková & Vare,

2010). Después estas IgA recién sintetizadas se unen a los receptores de inmunoglobulinas poliméricos que se expresan en la superficie basolateral de las células epiteliales, entonces estos anticuerpos son transportados por transcitosis a la superficie apical donde pueden bloquear la unión virus-célula (**Figura 5-B**) (Chen, 2018; Staneková & Vare, 2010). Su papel protector contra los virus de influenza se realiza cuando los extremos terminales de estos anticuerpos se pegan a los virus y bloquean la unión del virus con la célula, y de esta forma se evita la infección de las células del epitelio respiratorio (Maurer et al., 2018; Staneková & Vare, 2010). Se ha probado que la actividad de la IgA es entre 10 a 1 000 veces más neutralizante que otras inmunoglobulinas, pero también hay reportes que 1 de cada 300–600 individuos presentan deficiencia en la producción de IgA, estos hallazgos hacen necesario incrementar las investigaciones en este campo (Maurer et al., 2018).

### **1.6.2.- Inmunidad innata**

Una de las características de las células epiteliales, células pulmonares y del sistema inmunológico es que tienen receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) que pueden distinguir patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), en el caso particular del virus de influenza, sus componentes virales conservados serán los principales blancos de reconocimiento de estos PRRs (Chen, 2018; Kolls & Evans, 2017; Pizzolla et al., 2017; Rivas-Santiago, Bruno Tonatiuh; Torres Rojas, MArtha; Bobadilla Lozoya, Karen y Sada Diaz, 2005). Las células pueden reconocer a los virus con al menos tres clases distintas de PRR: Los receptores tipo Toll (TLR) particularmente los tipos 3, 7 y 8 que reconocen RNA viral (**Figura 5-B**), los receptores tipo RIG-I (RLR) que reconocen RNA y los receptores

tipo NOD (NLR) que reconocen un rango más amplio de estímulos (Chen, 2018; Pizzolla et al., 2017).

Una vez que los PRR captan alguno de los componentes virales mencionados, se induce la secreción de interferón (INF) tipo I y III que desempeñan un papel importante tanto en las células infectadas y no infectadas, regulando positivamente cientos de diferentes genes estimulados por interferón (ISG) (**figura 5-B**). Algunos ISG pueden tener acción directa contra el virus, o a nivel de la expresión de los RNA mensajeros virales y la traducción de proteínas, limitando eficientemente la replicación y propagación del virus (Chen, 2018; Killip et al., 2015). Otra molécula secretada por el estímulo de los virus en las células es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que provoca una respuesta proinflamatoria y junto con la IL-1 inducen moléculas de adhesión endotelial, que desencadenan la migración de células inmunes innatas, como macrófagos, células dendríticas (DC) y células asesinas naturales (NK) (**figura 5-C**) (Alejandra et al., 2014; Chen, 2018). Otras moléculas secretadas por las células son las citocinas y quimiocinas que promueven también el reclutamiento de células del sistema inmune, regulan los mecanismos de inflamación y modulan la secreción de inmunoglobulinas (Chen, 2018; Pizzolla et al., 2017).

La inducción quimiotáctica inicia una rápida migración de macrófagos, monocitos, neutrófilos, linfocitos T citotóxicos (CTL), NK y DC al sitio de la infección. Este conjunto de células limita la propagación viral mediante la fagocitosis de células infectadas en presencia o ausencia de anticuerpos, también pueden provocar la lisis de estas células que puede o no estar mediada por complemento dependiente de anticuerpos (ADCML, por sus

siglas en ingles) y también realizan la presentación de antígenos virales que promueven a la inmunidad adaptativa (Chen, 2018; Forthal, 2014; Jegaskanda, 2018).

### **1.6.3.- Inmunidad adaptativa**

Las células presentadoras de antígenos (APC) toman a través de la endocitosis o fagocitosis a los antígenos virales exógenos, a las partículas virales inactivas o a las células infectadas para procesarlos en proteosomas y los epítopes del virus o péptidos inmunitarios resultantes son unidos a moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Chen, 2018; Staneková & Vare, 2010). La MHC-I permite la presentación de los epítopes del virus a los linfocitos T CD8+, que a su vez desencadena la maduración a CTLs que eliminan a las células infectadas a través de la lisis de estas, mediante perforinas y granzimas (Chen, 2018; Staneková & Vare, 2010). Otra posibilidad es que las proteínas virales sean degradadas por endosomas/lisosomas, los péptidos resultantes se asocian a moléculas MHC tipo II y de esta forma se presentan estos antígenos a las células T cooperadoras precursoras (Th0) CD4+ que a su vez llevan a cabo la proliferación de Th0 a Th1 o Th2 dependiendo del perfil de citocinas. El perfil de citocinas promoverá la polarización de la respuesta hacia un perfil Th1 o Th2 según sea el caso: Para controlar la infección primero se iniciará una respuesta Th1, después de esto dicho perfil de citocinas puede cambiar, detonando una respuesta Th2, la cual es productora de anticuerpos específicos del agente patógeno (**Figura 5-C**) (Chen, 2018; Pizzolla et al., 2017; Staneková & Vare, 2010).

#### **1.6.4.- Inmunidad Humoral**

La respuesta inmune humoral esta mediada por inmunoglobulinas específicas sistémicas o locales que intervienen en distintos pasos de la replicación viral (Staneková & Vare, 2010). Durante la unión virus célula, las IgAs presentes en las mucosas o las IgGs en suero pueden bloquear directamente esta unión; estos anticuerpos se dirigen principalmente a la cabeza globular de HA, ya que es inmunodominante (Altman et al., 2018b; Henry et al., 2018; Staneková & Vare, 2010). La IgA e IgG también pueden unirse al dominio del tallo de HA que tiene poca variabilidad y donde pueden tener una reactividad cruzada más amplia que cuando interactúan con la cabeza, pero la respuesta del sistema inmunológico es inmunosubdominante (Altman et al., 2018b; Chen, 2018; Henry et al., 2018).

Antes y durante la adsorción del virus o justo en el momento previo a la liberación de sus ácidos nucleicos al citoplasma de las células, los anticuerpos se pueden unir a regiones entre HA1 y/o HA2 o a la proteína M2 y bloquear ambos pasos. Sin embargo, la alta plasticidad de HA y la débil inmunogenicidad de M2 hacen necesario poner a prueba estrategias que permitan desarrollar tratamientos más eficaces (Nachbagauer & Krammer, 2018; Staneková & Vare, 2010; Wang et al., 2015). Para el caso de HA se han desarrollado estrategias como tratar de quitar la cabeza globular de la hemaglutinina y dejar más expuesto al tallo, otra estrategia consiste en la construcción de cabezas globulares quiméricas de HA con dominios conservados de cepas de influenza A subtipo H3, H1 e influenza B y una terapia con anticuerpos monoclonales que van dirigidos tanto a la cabeza como al tallo de la proteína, con una protección probada en ensayos clínicos y con el potencial de servir en tratamiento contra infecciones zoonóticas (Henry et al., 2018;

Nachbagauer & Krammer, 2018). En el caso de M2 se han establecido estrategias con adyuvantes para conferir una mayor inmunogenicidad, acelerar la respuesta del sistema inmunológico, guiar la respuesta citotóxica y humoral, también se ha probado una proteína fusionada entre M2 más la proteína nuclear del virus de la hepatitis, demostrando el incremento de la protección in vivo frente a dosis letales del virus de influenza, además de una terapia de anticuerpos monoclonales que se mencionó para HA y que también puede ser utilizada contra M2 durante las infecciones del virus (Nachbagauer & Krammer, 2018; Staneková & Vare, 2010; Tregoning et al., 2017).

Al final del ciclo de replicación, cuando los viriones se están ensamblando y durante la gemación de estos, hay anticuerpos que pueden impedir el correcto ensamblaje o la liberación de la nueva progenie (Staneková & Vare, 2010). Se sabe de la existencia de los anticuerpos que impiden el ensamblaje de la nueva progenie viral y de los anticuerpos que impiden la liberación de la nueva progenie viral, aunque hacen falta investigación al respecto. Finalmente, la NA es una proteína de superficie inmunogénica involucrada en la liberación de los viriones, cuenta con epítopes conservados que pueden conferir protección heteróloga, y puede ser un enfoque distinto para mejorar la producción de anticuerpos protectores en las formulaciones de las vacunas actuales. (Eichelberger et al., 2018).

#### **1.6.5.- Células B y respuesta de anticuerpos**

La participación de las células B en la infección es múltiple porque está sujeta a su capacidad de reconocer a los antígenos del virus en su forma nativa y fungir como célula presentadora, durante la inmunidad adaptativa se diferencian a células plasmáticas

secretoras de anticuerpos (ASC) o cuando ocurre una segunda exposición a un virus se activan las células B de memoria (Hong et al., 2018; Jones et al., 2016). Un aspecto controversial y que se ha estudiado muy poco es la longevidad de estas células y como la primer exposición a una cepa de influenza puede establecer la magnitud y especificidad de la respuesta de los anticuerpos en una siguiente exposición, un concepto al que se le denomino “pecado original antigénico” el cual trata de explicar que la respuesta de anticuerpos está dominada por la primer cepa con la que se tuvo contacto y aunque a lo largo del tiempo, la persona envejece y está en contacto con otras cepas, el sistema inmunológico mantiene niveles altos de anticuerpos de la primer cepa de influenza con la que se tuvo contacto (Cobey & Hensley, 2017; Henry et al., 2018; Hong et al., 2018; Jones et al., 2016).

Un concepto más actual denominado antigüedad antigénica o impronta antigénica, resulta en un modelo más adecuado para explicar lo que sucede ante el primer contacto con un virus de influenza, propone que al primer virus se le asigna una posición privilegiada jerárquicamente dentro del repertorio inmunológico, y que cada cepa posterior adopta una posición jerárquica menor y sucesiva dentro del repertorio, además menciona que cada cepa nueva, pero del mismo subtipo va reforzando la respuesta de la inicial (Henry et al., 2018). Un mejor conocimiento de la impronta antigénica y su relación con la longevidad de las células B, podrían ser la clave para determinar con mayor precisión el mejor momento para realizar la primera exposición de un individuo a los virus de influenza, así como el tipo de contacto que desencadena una mejor respuesta inmunológica, el natural o por vacuna, y explorar la posibilidad de producir una vacuna universal (Henry et al., 2018; Jones et al., 2016).



### 1.6.6.- Citotoxicidad de las células dependiente de anticuerpos (ADCC)

Los anticuerpos además de recubrir a los virus para frenar la infección, también puede formar un puente entre las células infectadas y una célula efectora que contenga el receptor de la fracción cristalizable (FcR) del anticuerpo en cuestión (Forthal, 2014; Jegaskanda, 2018; Staneková & Vare, 2010). Las células que pueden tener este receptor son las NK, monocitos, macrófagos y neutrófilos que eliminan a las células infectadas mediante la fagocitosis, lisis o apoptosis. (Forthal, 2014; Jegaskanda, 2018; Staneková & Vare, 2010)

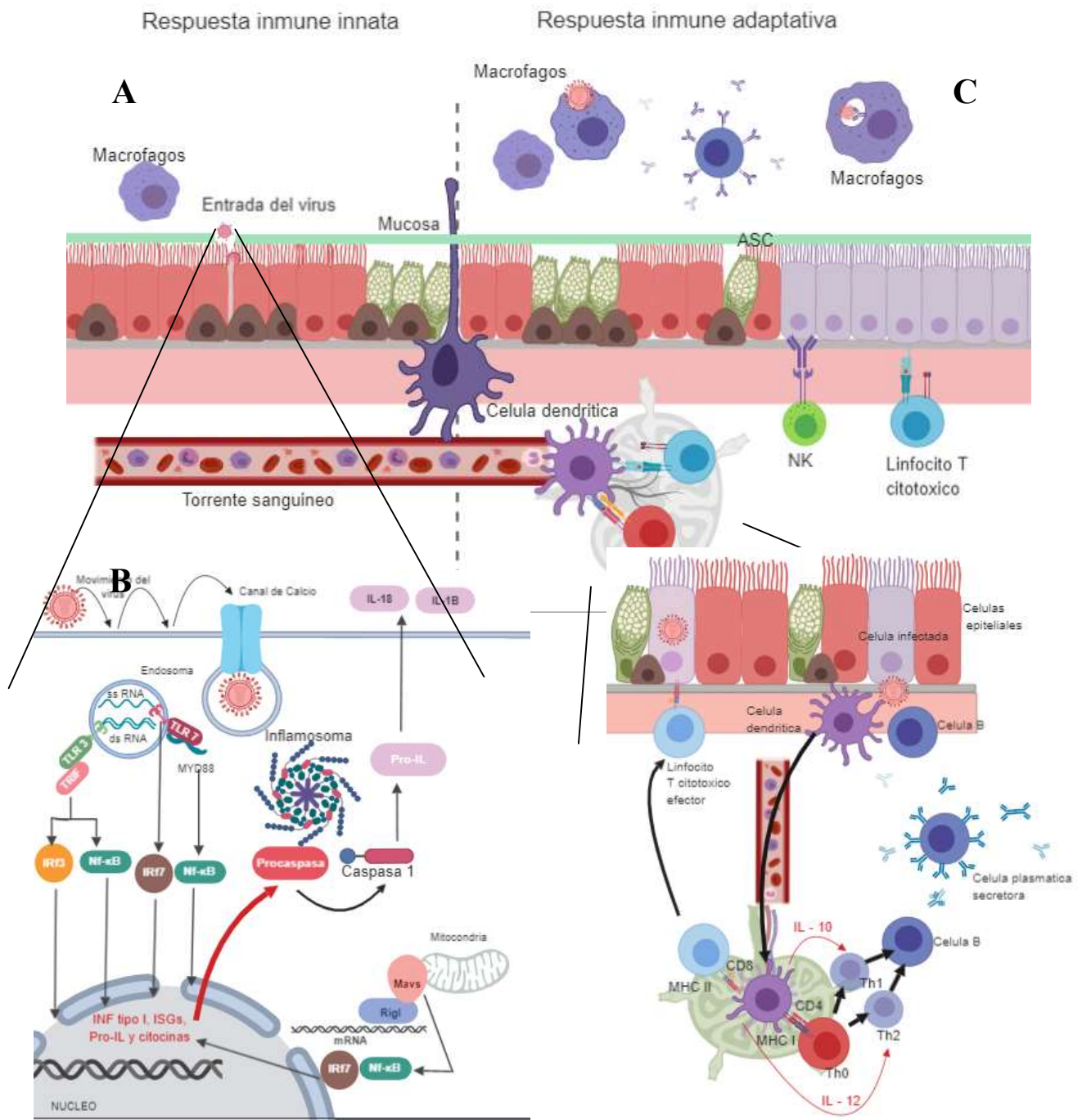


Figura 5.- Respuesta inmune innata, adaptativa e inducción de la respuesta humoral. (A) Antes de que los virus de influenza se unan a los receptores de las células epiteliales, las células dendríticas pueden fagocitar éstos virus o pueden fagocitar células infectadas, después migran las células dendríticas a los nódulos linfáticos locales para la presentación de antígenos. La presentación de antígenos a las células T CD4+ y/o TCD8+, promueve a su vez el reclutamiento de las NK y macrófagos que dan paso a las respuesta inmune adaptativa y humoral. (B) Los receptores PRR reconocen al patógeno vía TLR3, 7 y 8 que promueven la translocación al núcleo de Nf- $\kappa$ B, IRF3 e IRF7 que a su vez estimulan los ISG, INF, citocinas y quimiocinas que promueven la vía de las caspasas y las citocinas proinflamatorias. RIG-1 y MAVs pueden reconocer a RNAm y retroalimentar positivamente la secreción de ISG, INF, citocinas y quimiocinas. (C) La presentación de antígenos por MHC-I o MHC-II permite la proliferación de células Th0 a células Th2 cuando se co-estimulan con IL-10 o bien de Th0 a Th1 cuando se co-estimulan con IL-12, la proliferación de estas células por una parte producir más INF y por otra parte se activan y diferencian las células B a células secretoras de anticuerpos específicos de la infección en proceso.

## **1.7.- Impulsores evolutivos y origen de los virus de influenza**

### **1.7.1.- Cambio antigénico**

El re-arreglo es el proceso que permite a los virus segmentados, el intercambio de sus segmentos y también se le denomina cambio antigénico. La reorganización del material genético produce rápidamente variantes de virus que pueden ser marcadamente diferentes, genotípica y fenotípicamente de las cepas parentales (Marshall et al., 2013). Los virus de influenza A y B tienen su genoma dividido en 8 segmentos de RNA y en presencia de una co-infección con virus de diferentes subtipos o linajes, sus segmentos pueden re-arreglarse y dar origen a virus con proteínas totalmente distintas a los virus que los originaron (Petrova & Russell, 2018b; Richard et al., 2017). A pesar de que las aves son el principal

reservorio de los virus de influenza A, se propone que el surgimiento de nuevos re-arreglos con potencial pandémico sucede en los cerdos que son susceptibles a la infección por virus aviar y humano, a esta característica se le denomina “vaso de mezcla”. Aunque no se tiene evidencia directa de cómo se generaron los virus causantes de las tres pandemias del siglo XX, se sugiere que fue por virus que tuvieron múltiples re-arreglos en cerdos antes de infectar al humano, como sucedió en la primera pandemia del siglo XXI con virus circulando en cerdos de origen Euroasiático y Norte América, antes de infectar humanos (Richard et al., 2017; Smith et al., 2009; Wenjun Ma1, 2008). Tal vez, la principal limitante del cambio antigénico entre los virus de influenza durante una co-infección, es el inoculo tan elevado que se necesita para que se dé tal proceso, esto podría explicar porque es poco frecuente (Marshall et al., 2013).

### **1.7.2.- Deriva antigénica**

La deriva antigénica es un mecanismo asociado a cambios en la HA y NA principalmente, se debe a que las polimerasas de los virus son propensas a errores durante la replicación de su genoma y provoca la acumulación de mutaciones puntuales que producen sustituciones de aminoácidos (Abente et al., 2016; Altman et al., 2018b; McKinley et al., 2011; Stubbs & Te Velthuis, 2014). Una de las consecuencias de las mutaciones puntuales, es que cada año tenemos la presencia de virus antigénicamente distintos, que no pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico y sin necesidad de genes nuevos, como sucede con el mecanismo de cambio antigénico (Adi-Kusumo, 2017; Altman et al., 2018b).

La deriva antigénica, además de producir los cambios de aminoácidos, también puede modificar los patrones de glicosilación en la HA y NA, que protegen o exponen sitios antigénicos de HA y los sitios enzimáticos de NA, ante los anticuerpos producidos en humanos por infecciones previas o vacunación (Allen & Ross, 2018; Petrova & Russell, 2018b). La glicosilación se produce a través de la unión de una molécula de oligosacárido al nitrógeno amida de Asparagina (N-glicosilación) que se encuentra en el sequon Asn-X-Ser/Thr donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Prolina (Allen & Ross, 2018; York et al., 2019). La ganancia de este accesorio, en las proteínas de superficie de los virus ocurre con la ayuda de las glucosiltransferasas y oligosacariltransferasas en el retículo endoplásmico, seguido por el complejo proceso de recorte y remodelación de los oligosacáridos por glicosidasas y manosidasas durante el tránsito por el retículo endoplásmico y golgi (York et al., 2019). Además de ganar sitios de N-glicosilación, los virus pueden modificar su antigenicidad y afinidad al sitio de unión al receptor, por el aumento del potencial eléctrico en la cabeza globular de HA por aminoácidos cargados positivamente, que incrementa la avidéz del virus permitiendo una unión virus-célula antes de que los anticuerpos puedan reconocer los anticuerpos (Allen & Ross, 2018).

### **1.7.3.- Presión de selección por el hospedero**

Las tasas de mutación ejercidas por las RdRp de los diferentes virus de influenza, está en el rango de  $\sim 2 \times 10^{-6}$  a  $\sim 2 \times 10^{-3}$  mutaciones por sitio por ronda de replicación de genoma (Petrova & Russell, 2018b; Suzuki & Nei, 2000). Por su parte los re-arreglos del genoma entre los virus de influenza, implican altas cantidades de dos o más virus co-infectando a la vez un individuo, para generar un cambio antigénico, esto podría dificultar el éxito de este

mecanismo y explicar porque no sucede en un tiempo determinado y es muy poco frecuente (Marshall et al., 2013). También sabemos que se requieren de al menos de 3 a 10 cambios de aminoácidos en el dominio de la cabeza globular de HA para cambiar completamente la antigenicidad de un virus, descartando el cambio antigénico y asumiendo que únicamente la deriva antigénica es el único impulsor evolutivo, el resultado de que el 10% de la población mundial se infecte cada año con influenza y se produzcan alrededor de  $10^{12}$  viriones infecciosos, se requerirían de al menos mil millones de años para generar aleatoriamente una mutante de escape con un cambio completo de la antigenicidad (Altman et al., 2018a). Por lo tanto, ni siquiera infectando a toda la población mundial se generaría una presión selectiva sobre todos los sitios antigénicos, para producir mutantes de escape en un corto tiempo, pero todas las suposiciones anteriores parten del hecho de que sólo la deriva antigénica es el impulsor evolutivo, no se contempla al hospedero y su respuesta inmunológica.

La primera infección por influenza en la vida de un ser humano, implica no contar con una respuesta inmune innata ni adaptativa, que llevaría a un pico en el título viral entre las 24 a 72 horas después de la infección, dependiendo de la dosis infecciosa (Petrova & Russell, 2018a). El tiempo necesario para generar anticuerpos específicos contra el virus después de la infección es de 7 a 10 días, esta impronta antigénica (véase 1.6.5) sucede en la primera década de la vida y sesga la respuesta inmunológica hacia ciertos sitios antigénicos, a ciertas regiones de la proteína y preferentemente hacia las proteínas de superficie más abundantes de ese primer virus con el que se tuvo contacto. La producción jerárquica de anticuerpos sigue sucediendo con cada virus con el que se tenga contacto a lo largo de la vida, y se le denomina inmunodominancia, podría causar una baja efectividad de ciertas

vacunas que tengan sustituciones artificiales en dichos sitios inmunodominantes, sería responsable de la extinción de viejas variantes antigénicas tras la aparición de otras nuevas y es evidencia de la presión selección por la respuesta inmunológica del hospedero humano, que impulsa el surgimiento de virus con novedades evolutivas capaces de evadir la respuesta inmunológica (Altman et al., 2018a; Petrova & Russell, 2018a).

Una vez que un hospedero cuenta con una impronta antigénica o ha tenido contactos repetidos con ciertos virus de influenza, la respuesta inmunológica actúa como un cuello de botella, limitando la transmisibilidad de estos virus hacia otros individuos, lo que resulta en la pérdida de la diversidad viral o puede impedir la replicación del virus parental, pero no de su progenie con mutaciones, lo que resulta en un impulsor evolutivo. El alcance de estos cuellos de botella varía según la vía de transmisión, puede modificar la dinámica de una epidemia e impactar directamente en la evolución de los virus de influenza, también se tiene que tomar en cuenta la corta duración de las epidemias de influenza, la co-circulación de distintos tipos y subtipos de influenza que competirán entre sí, para establecerse como los virus dominantes de la temporada y de las siguientes epidemias (Petrova & Russell, 2018a).

Los mecanismos de cambio y deriva antigénica, junto con la presión de selección ejercida por el sistema inmunológico del huésped, permiten la evolución de influenza, aunado a la co-circulación de los subtipos y linajes de influenza durante el mismo periodo de tiempo, son la causa de que hasta este momento no se tenga una vacuna 100% efectiva. Otro aspecto a considerar son los virus que componen la vacuna, las vacunas trivalentes dejan fuera un linaje de influenza B que hace menos efectivas a las vacunas que se administran a

la población, sobre todo si el linaje de influenza B circulando predominantemente es el que no incluye la vacuna, como se ha observado en Inglaterra y Bulgaria durante 2017-2018 (Beyer et al., 2017; Gregory et al., 2017; Ju, 2017; Prandoni et al., 2012; Suptawiwat et al., 2017; Wise, 2018). Esto último se ha modificado en la recomendación de la OMS para la vacuna de la temporada 2018-2019, actualizando los subtipos de influenza A e incluyendo ambos linajes de influenza B, este ajuste se planea cada año y dependiendo de los virus que circularon en años anteriores se proponen a los virus con los que se realizará la vacuna de la siguiente temporada.

#### **1.7.4.- Participación del medio ambiente en la evolución de los virus de influenza**

El medio ambiente tiene una contribución significativa en la epidemiología y el establecimiento de las infecciones de influenza, (véase sección 1.3.2, 1.3.3 y 1.3.4). Otro aspecto en el que contribuye de forma notable el medio ambiente, es en la evolución de los virus de influenza. ¿Pero cómo la temperatura o la humedad relativa o la estacionalidad en las diferentes regiones del mundo, pueden impulsar la evolución de los virus? Hay varios hallazgos que pueden dar respuesta a este fenómeno:

Hay un par de trabajos donde muestran, que los niveles de persistencia de las gotas y aerosoles que contienen a los virus de influenza en el ambiente, se modifican por las condiciones de temperatura y humedad, inclusive esta persistencia difiere entre los tipos y subtipos de influenza; por otra parte, se ha estudiado a un virus de influenza H3N2 con un fenotipo NS1-V194I, que pierde viabilidad por efecto de la temperatura (Jiang et al., 2020; Kormuth et al., 2019). Esto supone que ciertos virus pueden ser más aptos en determinadas

condiciones ambientales, mientras que otros virus pueden desaparecer por efecto de la selección natural dada por las condiciones climatológicas.

La persistencia viral también se puede dar en el agua, particularmente, en los cuerpos de agua dulce de las zonas templadas y árticas que pueden beber hospederos susceptibles, esto puede desempeñar un papel importante en la diseminación y evolución viral. Varios investigadores coinciden que las condiciones más favorable para la persistencia viral en muestras de aguas son: bajas temperaturas  $<17^{\circ}\text{C}$ , un pH neutro o básico de 7.4 - 8.2, baja salinidad entre 0-200 000 ppm y bajos contenidos de amoníaco, pero en las condiciones distintas los virus pierden viabilidad y no se dispersan entre sus hospederos y se pueden extinguir (Morin et al., 2018).

Relacionado con los cambios estacionales en las diferentes regiones del mundo, revisamos la coincidencia epidemiológica con las temporadas de influenza (véase sección 1.3.2 y 1.3.2), pero al hacer comparaciones estadísticas del clima, muestra un efecto limitado en comparación con la densidad poblacional, que tiene una asociación lineal y positiva con las infecciones y propagación continua de virus con mutaciones genéticas, que pueden afectar la patogenicidad y la virulencia de los virus (Jiang et al., 2020; Lam et al., 2020). Por lo tanto, el comportamiento social humano tiene un papel fundamental en la diseminación de la enfermedad (véase sección 1.3.5) y está estrechamente relacionado con la aparición de virus con novedades evolutivas, además, permite la transmisión sostenida de virus, y esto da oportunidad a una competencia entre los diferentes tipos y subtipos de influenza para establecerse como el virus predominante cada temporada de influenza (Jiang et al., 2020; Lam et al., 2020).



Otro impulsor evolutivo de influenza que tiene que ver con la disponibilidad de los virus en el medio ambiente, son las aves, que se les considera el principal reservorio y modo de transmisión del virus muy eficiente, ya que puede alcanzar >20% de patos, gaviotas y aves playeras infectadas durante las temporadas de migración, intercontinentales e intracontinentales, adicionalmente, otro estudio ha detectado 1.3% de aves asintomáticas, mayormente acuáticas, que permite una mayor distancia de transporte de virus durante las migraciones. Similar a lo que ocurre en los seres humanos, el hacinamiento de las aves hace posible el surgimiento de mutaciones y re-arreglos en el genoma de los virus aviares, que son claves para alcanzar una transmisión sostenida hacia mamíferos incluyendo el ser humano, el surgimiento de estas novedades evolutivas son capaces de crear nuevas constelaciones genómicas (Morin et al., 2018; Wille & Holmes, 2020).

Las rutas migratorias de aves juegan un papel importante en la diseminación y el surgimiento de novedades evolutivas de influenza, pero no sería posible sin la geografía del mundo, particularmente en el hemisferio norte del planeta, el estrecho de Bering brinda una conexión entre Asia y América del norte, además de ser un sitio de hábitats de reproducción compartidos por especies migratorias y por lo tanto considerado como una zona de mezcla de diferentes virus de influenza. Diferentes estudios apoyan la importancia del estrecho de Bering al mostrar la introducción de virus desde China, Corea del Sur y Japón a través de aves migratorias, hacia diferentes especies de aves, incluyendo las de corral en Alaska y California que conservan genomas casi idénticos (Morin et al., 2018). Además del estrecho de Bering, Asia y norte América, en Europa se han observado virus aviares introduciéndose en cerdos, reemplazando progresivamente a los virus que anteriormente circulaban entre

ellos, o se han introducido genes aviarios a los virus porcinos, junto con la comercialización de cerdos vivos entre Europa, Asia y norte América, se pudo haber facilitado la mezcla de virus porcinos con los virus humanos que dieron origen en 2009, a el triple re-arreglo de virus aviar, porcino y humano causante de la pandemia de influenza H1N1 (Smith et al., 2009).

Otros aspectos de la actividad humana que tienen o tendrán un impacto en la evolución de los virus de influenza son: la agricultura, que puede atraer a aves migratorias o reemplazar los hábitats de estas; las granjas avícolas o de otros animales, pueden generar la propagación de los virus en estas granjas o nuevamente la pérdida de hábitats de las aves migratorias y finalmente el cambio climático puede influir, por el probable derretimiento de las zonas árticas, afectando los hábitats de reproducción compartidos por las especies de aves migratorias, aumentando o disminuyendo los cuerpos de agua dulce y modificar el pH, así como las concentraciones de amoníaco en el agua, en consecuencia, se pueden modificar dramáticamente los sitios de reproducción y favorecer o perjudicar la persistencia de los virus en estas condiciones (Morin et al., 2018).

Los hallazgos anteriores muestran diferentes aspectos del medio ambiente, interviniendo en la evolución de los virus de influenza, promoviendo el surgimiento de novedades evolutivas o generando la extinción de ciertos tipos o subtipos de virus, sin embargo, hay algunas medidas que puede utilizar el ser humano para eliminar eficientemente los virus. Las gotas y aerosoles generados por los individuos enfermos durante las temporadas de influenza son resistentes a la descomposición dependiente de la humedad, con sus excepciones, pero se pueden eliminar estas partículas de los espacios cerrados con el intercambio de aire y la

filtración, esto puede ser crítico para reducir la transmisión de estos virus en interiores (Kormuth et al., 2019). Otras medidas de protección son las mascarillas o respiradores usados en conjunto con desinfectantes y lavado de manos, mostrando ser eficaces en la prevención de infecciones de las vías respiratorias, por lo que el uso generalizado en las poblaciones densamente pobladas contribuye notablemente en retrasar y minimizar la cantidad de contagios (bin-Reza et al., 2012; Brienen et al., 2010; Leung et al., 2020).

### **1.7.5. Historia evolutiva de los virus de influenza**

Los ancestros de los virus de influenza debieron haber surgido en los océanos como virus de RNA, infectando seres marinos y luego salieron del agua junto con sus hospederos cuando exploraron y se adaptaron a los hábitats terrestres, se propone que esto sucedió hace cientos de millones de años. En particular la familia *Orthomyxoviridae*, donde se clasifican a todos los virus de influenza, parecen ser relativamente comunes en peces, donde se alberga una enorme diversidad filogenética, incluyendo virus similares a influenza B como el hallado en un pez (*Mastacembelus aculeatus*) indicativo de los orígenes antiguos de estos virus (Ryabov, 2020; Wille & Holmes, 2020; Zhang et al., 2020).

Las filogenias que representan la co-divergencia de los *Orthomyxoviridae* y sus hospederos, reflejan la compleja interacción virus-huésped a lo largo del tiempo y los saltos de los virus a otros hospederos. Tomando como referencia estas filogenias y considerando que las aves son un gran reservorio de los virus de influenza, se plantea que las aves han sido infectadas por milenios antes de que los seres humanos se infectaran con influenza, esto se sustenta con la observación de que HA y NA poseen secuencias altamente

divergentes difíciles de alinear y por las tasas de sustitución de aminoácidos en los diferentes genes del genoma de influenza. Utilizando las tasas de sustitución de aminoácidos, se estima que los tiempos de divergencia para las HA de los tipos de influenza A, B y la proteína homóloga, hemaglutinina esterasa (HE) de influenza C, ocurrió hace 8 000 años; la divergencia de los genes de HA entre los virus de influenza A y B se estima ocurrió hace unos 4 000 años y la divergencia de la HA entre los subtipos de los virus de influenza A se estima, que debió haber ocurrido hace 1 000 o 2 000 años (Shi et al., 2018; Suzuki & Nei, 2000; Wille & Holmes, 2020; Worobey et al., 2014).

Tomando en cuenta las tasas de sustituciones de nucleótidos por sitio por año de  $\sim 10^{-3}$ , sugieren que la diversidad genética de los virus de influenza A tienen un origen muy reciente, con respecto a los virus de influenza B que tienen un origen más antiguo, junto con la propuesta de la ocurrencia de un “barrido selectivo” de los genomas de influenza, alrededor de los 1800, provocaría que todas las constelaciones de virus aviáres y de mamíferos que actualmente circulan, se generarán en esa época (Wille & Holmes, 2020; Worobey et al., 2014). Pero si tomamos como referencia los datos históricos de las epidemias y pandemias de influenza, se debería considerar que los griegos describen brotes de influenza desde el 412 a.C., lo que supone que los virus de influenza A deberían estar circulando entre los seres humanos hace más de 2 000 años. Ambos enfoques, el que considera las tasas de sustituciones en los genomas o aminoácidos, o el que considera los datos históricos de las epidemias o pandemias; tienen sus limitaciones, uno por no haber disponibilidad de muestras de influenza más antiguas que las de 1918/19 y el otro por que se restringe a buscar signos y síntomas de las infecciones en los registros médicos, que

podieran confundirse con síntomas de otras enfermedades (Saunders-Hastings & Krewski, 2016; Wille & Holmes, 2020).

Hasta que podamos resolver y descubrir con mayor precisión la antigüedad de los virus de influenza, nosotros nos inclinamos por el momento, con la teoría de que los virus de influenza A deben de haberse introducido a los seres humanos, hace más de 2 000 años, porque las tasas de sustitución en aminoácidos estiman la divergencia del gen de la HA entre los subtipos de los virus de influenza A, hace 2 000 años y los historiadores médicos coinciden que el evento epidémico más antiguo por influenza debió de haber ocurrido en el 412 a.C., es decir, hace unos 2 433 años. Para determinar cuando surgieron los virus de influenza B, tomamos como referencia las tasas de sustitución de aminoácidos que ubican la divergencia de la HA, de los virus de influenza A e influenza B y la HE de influenza C, hace unos 8 000 años, además, al hacer filogenias con virus de peces (similares a influenza B) nos indica que los virus de influenza B son virus con un origen más antiguo que los virus de influenza A, en conclusión, los virus de influenza B surgieron hace más de 8 000 años, sin embargo, no sabemos exactamente en qué momento se introdujeron a la población humana (Ryabov, 2020; Saunders-Hastings & Krewski, 2016; Suzuki & Nei, 2000; Wille & Holmes, 2020).

Fundamental para la evolución de los virus de influenza en todos los hospederos estudiados hasta el momento, incluyendo el ser humano, es el re-arreglo de los segmentos de su genoma. Ante la dificultad de poder determinar con exactitud el momento de la introducción de los virus de influenza A en los humanos, debemos considerar que en algún momento antes de la pandemia de 1918, algunos segmentos de los genomas de virus de

influenza debieron haberse originado por re-arreglo en aves y cerdos, o los virus surgieron en los seres humanos y evolucionaron a una mayor virulencia, al adquirir genes aviares y/o porcinos; con la información genética de los virus de influenza española y los datos epidemiológicos de la época, tenemos suficiente información para establecer que la circulación sostenida de los virus de influenza entre humanos, comenzó en 1918 con el virus de influenza A(H1N1) (Saunders-Hastings & Krewski, 2016; Wille & Holmes, 2020). Posteriormente en 1957 se observaron re-arreglos entre los genes H2, N2 y PB1 entre virus de humanos y aves, dando lugar a la pandemia por virus de influenza A H2N2 y desplazó las infecciones por H1N1. De forma similar en 1968, surgió el virus de influenza A H3N2 a partir del subtipo H2N2 circulando en población humana, y con HA y PB1 adquiridos de reservorios aviares, causó por una parte la pandemia por H3N2 y por otra parte causó la co-circulación de los subtipos H3N2 y H2N2 en humanos, hasta que poco a poco fue disminuyendo la prevalencia del subtipo H2N2 hasta 1971, cuando prácticamente fue desapareciendo de la población. En 1977 resurgieron los virus de influenza A H1N1 y desde ese momento co-circularon junto con el subtipo H3N2. Finalmente, en 2009 el triple re-arreglo entre virus aviar, porcino y humanos causó la primer pandemia del siglo XXI (Anhlan et al., 2011; Scholtissek et al., 1978; Smith et al., 2009; Wille & Holmes, 2020).

El re-arreglo de los segmentos del genoma entre los subtipos de influenza A, ocurren con poca frecuencia en humanos y se asocia con eventos pandémicos. Sin embargo, hay reportes de virus H1N2 detectados esporádicamente en humanos y la co-infección con diferentes subtipos de influenza en un solo individuo, sin que hasta el momento se reporte el surgimiento de un virus novedoso, tal vez, por una baja aptitud de estos virus surgidos

por re-arreglo en población humana (Tatiana Schäffer Gregianini, Ivana R. Santos Varella & Leticia Garay Martins, n.d.; Wille & Holmes, 2020; Zhu et al., 2013).

Los re-arreglos también suceden en los virus de influenza B, antes de 2016 se registró que los genes NA y NP de virus del linaje Victoria se adquirieron a partir de virus Yamagata, mientras que en el periodo 2016-2019 surgieron por re-arreglo y co-circularon, múltiples clados con deleciones de aminoácidos en el linaje Victoria sin asociarse con pandemias. La deriva antigénica en la HA y NA registradas en las regiones de la cabeza antigénica, son otro impulsor evolutivo, indicativo de la escapatoria del virus de la respuesta inmune del hospedero, en ambos linajes de influenza B suceden y moldean las constelaciones genéticas que actualmente existen, asociándose con un aumento de 10-12 sitios de glicosilación desde su división en los linajes Victoria y Yamagata (Suptawiwat et al., 2017, 2018; Virk et al., 2020; York et al., 2019). Una posible explicación a la falta de pandemias por virus de influenza B, puede ser la limitada cantidad de hospederos susceptibles a la infección en comparación con los virus de influenza A y en consecuencia los virus de influenza B circulando en población humana, tienen menor variabilidad genética por fenómenos de re-arreglos y por lo tanto las posibilidades fenotípicas están reducidas. Otra consecuencia de la falta de variabilidad fenotípica en los virus de influenza B, podría correlacionarse con una mayor inmunodominancia de los anticuerpos presentes en las poblaciones humanas, y puede explicar porque estos virus causan solamente enfermedad leve a moderada, reportada en la mayoría de los casos (Altman et al., 2018; Bodewes et al., 2013; Long et al., 2019).

La deriva antigénica como impulsor evolutivo se encuentra también presente en el subtipo de influenza A(H1N1), provocando sustitución de aminoácidos desde 1918-1957, las tasas

de sustitución en este periodo fueron más altas que las registradas durante su reintroducción en 1977 y 2009, esto nos indicaría que la tasa evolutiva en este subtipo se ha ralentizado con el tiempo (Suptawiwat et al., 2018). En contraste, el subtipo de influenza H3N2 desde su aparición en 1968 tiene una tasa evolutiva más alta en comparación con los actuales H1N1 y más similar a los H1N1 de 1918 (Petrova & Russell, 2018b; Wille & Holmes, 2020; York et al., 2019). Tal vez, el proceso definitivo de la evolución de los virus de influenza, al menos en humanos, es la deriva antigénica, que permite la fijación de mutaciones en la HA y NA, que a su vez, logran la sustitución de aminoácidos, la adición de sitios de glicosilación y el cambio de las cargas eléctricas netas en la cabeza de la proteína, estas novedades evolutivas están relacionadas directamente con la selección natural, dada por la evasión de la respuesta inmunológica (Allen & Ross, 2018; Wille & Holmes, 2020; York et al., 2019). Las variantes antigénicas surgen a tasas evolutivas diferentes entre los tipos y linajes de influenza A y B, para los virus de influenza A(H3N2) se estima suceden alrededor de los 2 a 5 años, para los virus de influenza A H1N1 van de los 3 a 8 años, para el linaje Victoria entre 3 a 5 años y el linaje Yamagata de 6 a 7 años, esto explica porque un humano puede infectarse varias veces a lo largo de su vida (Petrova & Russell, 2018b; Virk et al., 2020; Wille & Holmes, 2020).

Las diferencias en las tasas evolutivas generan ritmos evolutivos distintos para cada subtipo y linaje de influenza, que suponen revisar cada uno a detalle, sin embargo, sólo nos centraremos en las novedades evolutivas del subtipo H3N2 desde 2009 hasta 2017, debido a que el presente trabajo está enfocado en la circulación de estos virus en población mexicana a inicios de 2018 y su evolución en Norteamérica hasta la fecha. La primera diferencia evolutiva en H3N2 desde su surgimiento en 1968, se registró en 2005 utilizando



técnicas de hemaglutinación, descubrieron que todos los virus de este subtipo se unen preferentemente a ácidos sálicos  $\alpha 2,6$ , inclusive esta característica permanece en los virus actuales, en contraste, el resto de los subtipos y linajes de influenza se unen a ácidos sálicos  $\alpha 2,3$ ; la otra diferencia en el subtipo H3N2, está dirigida a la posición 159 dentro del sitio antigénico B de la HA identificada como la causa de la transición en las características antigénicas, mostró el predominio de Serina desde 1968 hasta 1987 cuando paso a Tirosina, desde 1987 y hasta 2004 paso de Tirosina a Fenilalanina, y en 2014/2015 volvió a cambiar por Tirosina en el clado 3C.2a y Serina en el clado 3C.3a (Allen & Ross, 2018; Kissling et al., 2018). El árbol filogenético (**Figura 6**) muestra su raíz en el clado 3C, tomando como referencia el virus A/Perth/16/2009, que se utilizó para la formulación de la vacuna desde 2009 hasta 2012, durante este mismo periodo permaneció estable la posición 159 de HA en los virus en circulación, pero los cambios acumulados en otros sitios antigénicos provocaron el cambio de la cepa vacunal en 2012-2013 por A/Victoria/361/2011 que seguía filogenéticamente dentro del clado 3C. Durante 2011 y hasta 2014, el predominio del subtipo H3N2 en la población mundial impulso la derivación de los clados 3C.1, 3C.2 y 3C.3, a partir del clado 3C y la derivación del clado 3C.2a a partir del clado 3C.2; el surgimiento de estos clados determinó el cambio de recomendación de la cepa de la vacuna por A/Texas/50/2012 para la temporada 2014-2015, este virus se clasifica dentro del clado 3C.1 (Jorquera et al., 2019; Tewawong et al., 2015). En 2014-2015 coincidieron los cambios en la posición 159 de HA de Fenilalanina por Tirosina en el clado 3C.2a y Serina en el clado 3C.3a, junto con el surgimiento de los clados 3C.2b, 3C.3a, 3C.3b y el subclado 3C.2a1 (Jorquera et al., 2019; Kissling et al., 2018; Tewawong et al., 2015). Los análisis antigénicos mostraron que los clados 3C.3 y 3C.3b eran antigénicamente similares a A/Texas/50/2012, mientras que los clados 3C.3a y 3C.2a eran antigénicamente distintos,

esto provocó que para la temporada 2015-2016 se modificara la recomendación del componente de la vacuna por A/Switzerland/97/2013 perteneciente al clado 3C.3a (Jorquera et al., 2019; Kissling et al., 2018). Con la vacunación del componente A/Switzerland/97/2013 en 2015-2016, coincidió con que el clado 3C.2a se convirtió en el grupo predominante, este desajuste en la divergencia antigénica causó que se modificara la recomendación de la vacuna para 2016-2017, proponiendo a un virus que pertenece al clado 3C.2a, el virus A/Hong Kong/4801/2014 (Jorquera et al., 2019). Durante 2016-2017 al aplicar la vacuna con el virus A/Hong Kong/4801/2014 en la población, se documentó el surgimiento de los subclados 3C.2a2, 3C.2a3, 3C.2a4 y 3C.2a1b, a pesar del surgimiento de estos subclados la recomendación de la vacuna se extendió hasta 2017-2018 (Jorquera et al., 2019; Kissling et al., 2019; Melidou & Broberg, 2017; Suntronwong et al., 2017; Tsou et al., 2017; Yang et al., 2018). Otro aspecto observado durante la aplicación de la vacuna con el componente A/Hong Kong/4801/2014, es la ganancia de una Lisina en la posición 160 de HA, obtenida artificialmente en la cepa vacunal durante la adaptación de los virus a los embriones de pollo para la elaboración de la vacuna, el cambio de este aminoácido confiere una potencial pérdida de la glicosilación, en consecuencia los anticuerpos generados con esta vacuna coincidieron con una baja efectividad de la vacuna durante 2016 y hasta 2018 (Kissling et al., 2019; Skowronski et al., 2018). El actual trabajo se enfoca en los virus de influenza A(H3N2) circulando en población mexicana a inicios de 2018, antes de mostrar los resultados obtenidos mencionaremos a continuación los tratamientos y vacunas disponibles contra influenza.

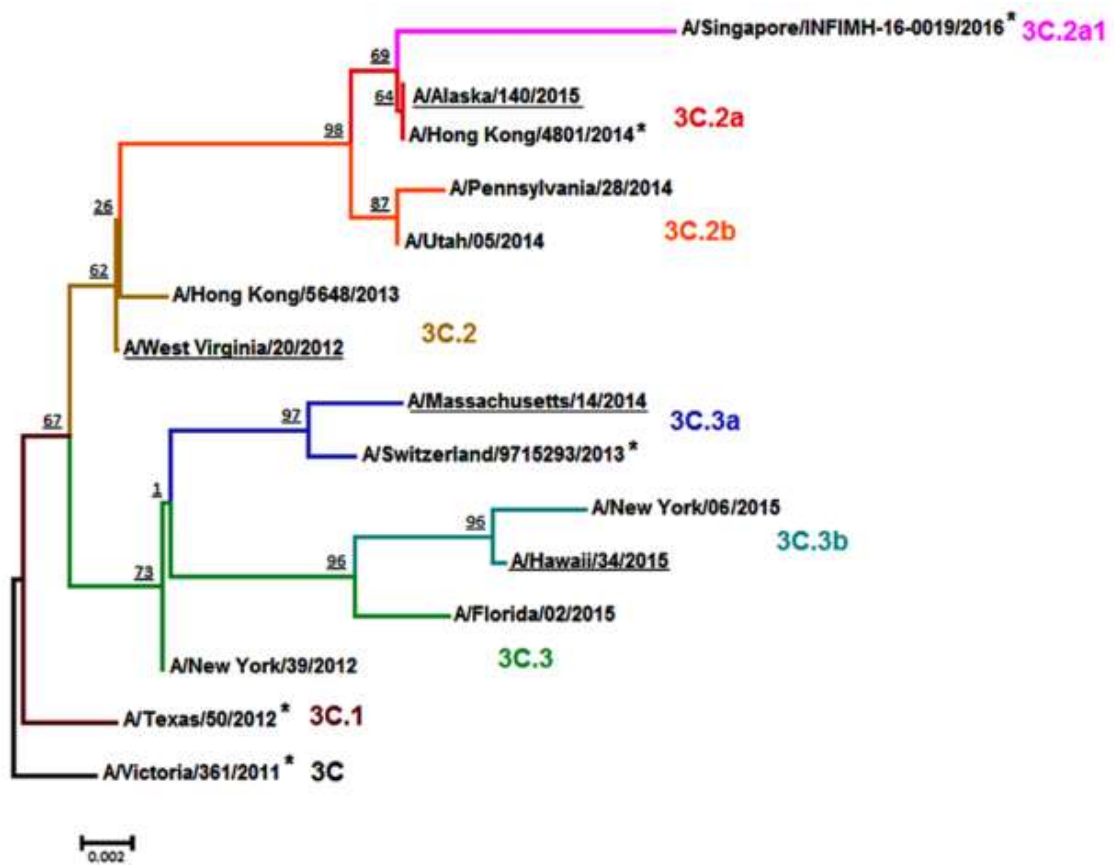


Figura 6.- Tomado de (Jorquera et al., 2019). Virus de influenza A(H3N2) representativos de las temporadas de influenza 2011-2017.

## 1.8.- Vacunas

Las vacunas son un producto biológico confiable y seguro de inocular a las personas para inducir una respuesta inmunitaria, que los proteja frente a las infecciones y/o enfermedades causadas por una exposición posterior a los patógenos. Los componentes esenciales en la mayoría de las vacunas actuales son uno o más antígenos proteicos o polisacáridos derivados de los patógenos o producidos sintéticamente para representar componentes de los patógenos (Ignacio., 2002).

### **1.8.1.- Historia de las vacunas**

Los primeros procesos de vacunación en humanos se remontan al siglo XII en China, sin embargo, fue hasta 1796 cuando Edward Jenner inoculó virus de la viruela bovina al niño James Phipps y lo protegió de la viruela, a este procedimiento lo denominó vacunación (Ignacio., 2002).

En 1803 el rey Carlos IV de España solicitó la vacunación en masa de toda la población de los territorios de la corona española de América y Asia, introduciendo en 1804 en Yucatán la técnica de inoculación de la viruela de brazo en brazo a cargo del Dr. Francisco Xavier de Balmis. Posteriormente se realizan inmunizaciones contra la rabia, la polio y tuberculosis de forma exitosa en México y el país empieza a producir las vacunas que lo convierte en el Centro Regional de Referencia para Vacunas, para 1990 ya es uno de los siete países del mundo autosuficientes en la elaboración de vacunas del Programa Ampliado de Inmunizaciones (Ignacio., 2002).

En 1998 México deja de ser autosuficiente en vacunas y en 1999 nace BIRMEX (Biológicos y reactivos de México) para producir, importar, distribuir y comercializar vacunas, sueros y reactivos para la población mexicana. Actualmente sigue siendo la institución líder en México en acciones de vacunación del país (Ignacio., 2002).

### **1.8.2.- Vacuna de influenza**

El primer paso para hacer la vacuna de influenza se da en 1930 cuando se aísla el virus de la influenza, esto les permitió a Smith, Andrewes, Laidlaw, Francis y Burnet perfeccionar el aislamiento y cultivo de los virus para que en 1940 Thomas Francis y Jonas Salk junto con el apoyo del ejército de los Estados Unidos de América desarrollarán la primera vacuna inactivada de influenza (CDC., 2019b). En 1942 se comienzan a producir vacunas bivalentes después del descubrimiento de influenza B. Después de la pandemia de 1957-1958 se cambia la composición de la vacuna y se recomienda la vacunación de influenza anual en respuesta a la morbilidad y mortalidad de la pandemia. En los siguientes años con el surgimiento de influenza A(H3N2) (1968) y reaparición de influenza A(H1N1) (1978) surge la vacuna trivalente (Macias-Hernandez., et al 2020; CDC., 2019b). Para la temporada de influenza 2012-2013 a consideración de la circulación de dos linajes de influenza B la OMS propone la formulación tetravalente, pero fue hasta la temporada de 2018-2019 que la OMS recomienda el uso preferente de la vacuna tetravalente (Macias-Hernandez., et al 2020).

Desde la primera vacuna de influenza en 1940 y hasta hoy, el proceso de fabricación es principalmente a base de huevos, tanto para las vacunas inactivadas como para las vacunas atenuadas. El proceso de producción de la vacuna comienza cuando los laboratorios de los CDC o alguno de los socios del Sistema de Respuesta y Vigilancia Global de la influenza de la OMS entregan los virus candidatos para las vacunas y los inyectan en huevos de gallina fertilizados para que los virus repliquen por varios días, se inactiven y/o purifiquen según los requisitos regulatorios de la FDA (CDC., 2021b). Los fabricantes de las vacunas

se enfocan en fabricar las vacunas con 15  $\mu\text{g}$  de hemaglutinina, recientes técnicas enfocadas a cuantificar neuraminidasa muestran que la proporción entre la neuraminidasa/hemaglutinina en algunas formulaciones de la vacuna son entre 1/5 y hasta 1/100, estas relaciones están muy por debajo de la relación teórica de estas proteínas de superficie en los virus (Xu et al., 2018). La subestimación de la neuraminidasa en las formulaciones de las vacunas podría ayudar a explicar la baja efectividad de las vacunas, pero se carecen de estudios al respecto y abre la oportunidad para proponer líneas de investigación al respecto.

La vía de administración también puede ser crucial para obtener mejores resultados de las vacunas, por ejemplo, se ha probado que la vía parenteral produce IgG sérica, pero no hay IgA, mientras que por vía intranasal se inducen ambas inmunoglobulinas (Chen, 2018) Otro aspecto a considerar para poder conocer el funcionamiento *in vivo* de los anticuerpos y diseñar vacunas que actúen en regiones ampliamente conservadas de los virus es la creación de mapas antigénicos de epítomos ADCC, mayor conocimiento de la inmunodominancia de los CTLs y cómo contribuye a la afinidad de unión entre epítomos del virus con células infectadas, considerando que el procesamiento de las proteínas virales que se da en los proteasomas, resultando en péptidos que se presentarán por las moléculas MHC de clase I, sin embargo, México carece de estudios amplios de los haplotipos de HLA en su población amerindia, mestiza y su relación con el virus de influenza, esto con la finalidad de establecer un mejor conocimiento de la respuesta inmune y generar estrategias preventivas más efectivas ante las pandemias y epidemias de influenza (Altman et al., 2018b; Soto-nava et al., 2018; Staneková & Vare, 2010).

### **1.8.3.- Efectividad de la vacuna de influenza**

La vacunación es eficiente, rentable y la principal medida de prevención de las epidemias. Para asegurar su seguridad, inmunogenicidad, eficacia y efectividad, se realizan diferentes estudios antes y durante su aplicación en las poblaciones (Bansal et al., 2021; Wei et al., 2020).

Nosotros sólo nos centraremos en la EV, que mide la capacidad que tienen las vacunas para evitar la enfermedad en los individuos inmunizados, entre los diferentes grupos de edad de las diferentes regiones del mundo. Hay diferentes diseños de estudio, pero el más ampliamente utilizado es la comparación de la frecuencia con la que las personas de los grupos vacunados y no vacunados contraen influenza, estos estudios se les denomina diseño de prueba negativa (Bansal et al., 2021; CDC., 2021b; Wei et al., 2020).

En el diseño de prueba negativa generalmente los individuos buscan atención médica por una ESI, los centros de salud y las unidades de urgencias recopilan toda la información referente al estado de vacunación, signos y síntomas, además se someten a estudios de detección de influenza específicos y sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La proporción de personas vacunadas y no vacunadas se compara entre pacientes con y sin influenza confirmada por el laboratorio (también llamados “casos”) y la relación con las personas vacunadas y no vacunadas con ESI y que no tienen influenza (también llamados “controles”) usando nuevamente la confirmación por el laboratorio. Este diseño reduce los sesgos de selección debido a los comportamientos de búsqueda de atención médica (Bansal et al., 2021; CDC., 2021b; Wei et al., 2020).

## **2.- Objetivos**

### **Objetivo general**

Analizar la información genética de los virus de influenza y determinar la efectividad de la vacuna en la población mexicana a inicios del año 2018 en la Ciudad de México.

### **Objetivos particulares**

Comparar las características de la población analizada, como la edad, sexo y comorbilidades, entre los casos y controles.

Analizar las asociaciones de casos y controles en relación a la infección de influenza con un modelo multivariado ajustado por factores de confusión como la vacunación, la edad y sexo.

Realizar análisis filogenéticos para determinar las identidades de los virus de influenza aislados en población mexicana con respecto a la cepa vacunal.

Examinar las sustituciones de aminoácidos dentro de los cinco sitios antigénicos y determinar los fenotipos de los virus presentes en individuos mexicanos con respecto a la cepa vacunal.



### **3.- Antecedentes**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Proyecto GLaMOR estiman que cada año la influenza causa mil millones de casos y una mortalidad de 389 000 individuos globalmente, razón por la cual esta enfermedad es uno de los grandes retos de salud pública (Paget et al., 2019; WHO, 2019).

Vacunarse contra la influenza es una de las mejores estrategias de prevención. Las vacunas se han asociado con reducciones en las hospitalizaciones y casos graves de la enfermedad, incluso cuando los virus que infectaron a los pacientes no coincidían con la composición de la vacuna contra la influenza. Sin embargo, la efectividad de la vacuna contra la influenza (VE) contra el virus es generalmente baja (Centers for Disease Control and Prevention., 2019; Domínguez et al., 2017; Mulpuru et al., 2019; Rose et al., 2020).

Se ha planteado la hipótesis de que las altas tasas de mutación de este tipo de virus pueden estar asociadas con una menor EV de influenza (Centers for Disease Control and Prevention., 2019; Jorquera et al., 2020).

Durante la temporada de influenza 2017-2018 la EV en Norteamérica osciló entre el 17% y el 62%, según el subtipo o linaje de influenza analizado. El subtipo A(H3N2) fue el virus predominante, con una EV del 17% al 22% y un incremento inusual de hospitalizaciones y fallecimientos. Esta temporada ha considerada como una de las más severas de las últimas décadas (Potter et al., 2019; Rolfes et al., 2019; Skowronski et al., 2018).

La variación antigénica de los virus de influenza A(H3N2) no ha sido analizada en México. En este trabajo nos enfocamos en la caracterización genética de los virus de influenza y determinamos la EV en la población mexicana a principios de 2018 en la Ciudad de México.

## **4.- Metodología**

### **4.1.- Participantes**

Todos los pacientes ambulatorios con enfermedad similar a influenza (ESI) que se presentaron de enero a abril de 2018 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), en la ciudad de México. Sólo se incluyeron aquellos que dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio (ver declaración de ética). La ESI se definió con base en el criterio de fiebre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  y tos, con inicio de síntomas no mayor a 15 días en el momento de la atención (Castillejos et al., 2019). Se recolectó mediante hisopado nasofaríngeo una muestra respiratoria y se realizó un historial clínico, demográfico y epidemiológico de cada participante.

### **4.2.- Diagnóstico de influenza**

El diagnóstico de influenza se realizó según lo descrito por Castillejos et al. (2019). Brevemente, primero se realizó una prueba de diagnóstico rápido de influenza (RIDT) utilizando muestras respiratorias frescas obtenidas de los pacientes y luego, el resultado fue corroborado por qRT-PCR, considerado estándar de oro (Castillejos et al., 2019).

### **4.3.- Secuenciación de hemaglutinina**

Debido a los informes sobre la prevalencia del virus de la influenza durante 2017-2018, nos enfocamos en amplificar sólo el gen de la hemaglutinina (HA) del virus influenza A(H3N2) (1500 pb) usando Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad,CA)

y el set de primer: HA-29F 5' AAGCAGGGGATAATTCTATTAACC 3' y HA-955R 5' GGTTTGTCATTGGGAATGCT 3' (926 bp); HA-298F 5' CTCAGTGTGATGGCTTTCAA 3' y HA-1194R CTGCTTGAGTGCTTTTGAGATCTG 3' (896 bp); HA-936F 5' AGCATTCCCAATGACAAACC 3' y HA-1716R 5' GCATCTAATGTTGCCCTTTGGCAGGC 3' (780 bp).

Las mezclas de reacción y condiciones de termociclado fueron realizadas de acuerdo a las instrucciones del kit Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad,CA). Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5%, para su posterior purificación y concentración a 9 µL con el kit de DNA Clean & Concentrator de Zymo Research siguiendo las instrucciones del fabricante. El total de las muestras purificadas se mezclaron con reacción de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad,CA), utilizando el mismo conjunto de primers mostrado anteriormente. Las secuencias se obtuvieron con un analizador genético ABI Prism 3730 (Life Technologies) y se ensamblaron utilizando BioEdit V7.0.5.3 y MEGA 7.0. Las secuencias se pueden encontrar en GenBank (números de acceso MZ823415-MZ823444).

#### **4.4.- Análisis filogenético**

Se utilizó como referencia la secuencia genética de 63 virus de influenza A(H3N2) de los clados y subclados 3C, 3C.1, 3C.2, 3C.2a, 3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2, 3C.2a3, 3C.2a4, 3C.2b, 3C.3 y 3C.3a obtenidos de GISAID fueron utilizados como referencia (Jorquera et al., 2019; Kissling et al., 2018; Yang et al., 2018). Las HA de los virus de referencia junto

con las secuenciadas en este estudio se alinearon utilizando Clustal W y MEGA 7.0. El análisis filogenético se realizó con Maximum Likelihood basado en Hasegawa-Kishino-Yano con 1,000 iteraciones de arranque para el soporte estadístico y para poder estimar la distancia evolutiva entre las secuencias analizadas a partir de las diferencias observadas entre las mismas secuencias. También se tradujeron las secuencias alineadas en residuos de aminoácidos con BioEdit V7.05.3, tomando como referencia el virus A/Hong Kong/4801/2014 para conocer los cambios no sinónimos dentro y fuera de los sitios antigénicos, además se determinaron los posibles sitios de glicosilación unidos a N utilizando el servidor NetNGlyc 1.0 y se localizaron las firmas de lisina.

Para las figuras complementarias, utilizamos todas las secuencias disponibles en la plataforma GISAID desde octubre de 2016 hasta marzo de 2022, colapsando las secuencias idénticas y construyendo árboles filogenéticos con el programa FastTree (Versión 2.1.7).

#### **4.5.- Definición de vacunados, casos y controles.**

Un paciente ambulatorio se consideró vacunado, si fue inmunizado con la vacuna antigripal trivalente en los  $\geq 21$  días antes de la toma de la muestra respiratoria. El grupo de casos consistió en pacientes ambulatorios vacunados y no vacunados con diagnóstico clínico de ESI y con resultado positivo de la prueba de qRT-PCR. El grupo de control estaba formado por pacientes vacunados y no vacunados con diagnóstico clínico de ESI, pero con un resultado negativo en la prueba de qRT-PCR.

#### **4.6.- Análisis estadísticos.**

Primero calculamos estadísticas descriptivas para caracterizar la población de estudio. Luego se calculó una prueba de  $\chi^2$  para comparar las variables de edad, sexo, grupos de edad, comorbilidades, vacunación antigripal, contactos, viajes, signos y síntomas entre casos y controles. Determinamos las comorbilidades, los signos y síntomas asociados a una mayor probabilidad de infectarse por el virus de la influenza en casos y controles. Luego determinamos los valores de la razón de probabilidades (OR) a través de pruebas de regresión logística incondicional bivariada con sus intervalos de confianza (IC) del 95%.

La EV se determinó utilizando un enfoque de prueba negativo para todos los participantes. Estratificamos por grupo de edad, tipo, subtipo, clados y subclados de influenza usando la ecuación  $(1-OR) \times 100$ , insertando los valores de OR calculados anteriormente (Castillejos et al., 2019).

La asociación entre el estado de caso o control y la infección se analizó a través de un modelo multivariante ajustado por posibles factores de confusión como la vacunación, la edad, el sexo y el número de síntomas y comorbilidades. También realizamos un modelo multivariante para el subtipo A(H3N2) y otros tipos y subtipos de influenza (ajustado por posibles factores de confusión como el tipo de vacuna, la edad, el sexo y la cantidad de síntomas y comorbilidades). Todos los análisis estadísticos se calcularon con el paquete estadístico SPSS 20 y se consideraron significativos a  $P < 0.05$ .

## 5.- Resultados

### 5.1.- Características de pacientes ambulatorios

Los casos y controles tenían una mediana de edad de 22.9 años y 23.6 años respectivamente (**Tabla 1**). Los signos y síntomas más frecuentes fueron tos, rinorrea y malestar general, siendo el asma, rinitis alérgica y diabetes las comorbilidades más frecuentes. Comparamos casos y controles corrigiendo por sexo, grupo de edad ( $\leq 17$  años y  $\geq 18$  años), comorbilidades, vacunación contra influenza, contacto con enfermos con influenza y viajes. No observamos diferencias estadísticamente significativas. Entre los signos y síntomas encontramos diferencias significativas con tos ( $p=0.0001$ ), rinorrea ( $p=0.04$ ), malestar general ( $p=0.0001$ ), fiebre ( $p=0.01$ ), cefalea ( $p=0.04$ ), escalofríos ( $p=0.0001$ ), mialgias ( $p=0.0001$ ), artralgias ( $p=0.0001$ ), conjuntivitis ( $p=0.0001$ ), dolor torácico ( $p=0.0001$ ) y cianosis ( $p=0.02$ ).

<b>Tabla 1.- Características demográficas y clínicas de casos y controles</b>			
Variable	Casos n = 90	Controles n = 150	P
Edad, mediana	22.9	23.6	NA
Mujeres	45	83	0.8
<b>Grupos de edad (años)</b>			
≤ 17	50	70	0.18
≥18	40	80	
<b>Comorbilidades</b>			
Asma	7	13	0.95
Rinitis alérgica	6	9	0.83
Diabetes	5	7	0.76
Hipertensión	3	7	0.61
Fumador	2	4	0.83
Inmunosupresión	0	3	0.33
EPOC	1	1	0.71
<b>Vacunación de influenza</b>			
Si	32	70	0.09
Mujeres	20	41	
<b>Contactos y viajes</b>			
Contacto con pacientes influenza	62	107	0.68
Viajes	13	18	0.58
<b>Signos y síntomas</b>			
Tos	87	129	<b>0.00</b>
Rinorrea	84	127	<b>0.04</b>
Ataque general	82	117	<b>0.00</b>
Fiebre	81	115	<b>0.01</b>
Odinofagia	70	117	0.96
Dolor de cabeza	75	108	<b>0.04</b>
Escalofríos	74	93	<b>0.00</b>
Inicio súbito de síntomas	64	97	0.30
Mialgias	77	79	<b>0.00</b>
Postración	60	91	0.35
Artralgias	72	73	<b>0.00</b>
Conjuntivitis	53	62	<b>0.00</b>
Disnea	43	65	0.50
Disfonía	43	60	0.23
Dolor de pecho	47	49	<b>0.00</b>
Dolor abdominal	39	49	0.09
Diarrea	19	19	0.08
Cianosis	3	18	<b>0.02</b>
Perturbación de la conciencia	4	5	0.66



NA: No aplica; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Viajes: considerados todos los realizados en los últimos 15 días antes de presentar síntomas

## 5.2.- Efectividad de la vacuna contra la influenza

Los casos y controles se compararon por estado de vacunación (**Tabla 2**) y se usaron para las estimaciones de EV. Si bien los análisis de EV arrojaron valores de P no significativos, la EV tendió a ser menor en el grupo  $\geq 18$  años (14.7%). Aunque la EV fue generalmente baja para toda la población de estudio (36.9%), se observó una EV más alta en el grupo  $\leq 17$  años (48.9 %).

<b>Table 2.- EV en pacientes ambulatorios a principios de 2018.</b>					
<b>Casos y controles por estado vacunal</b>			<b>EV estimada</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC del 95%</b>	<b>Valor P</b>
<b>Todos (totales)</b>					
Vacunado	32	70	36.95	(0.36 – 1.07)	0.09
No vacunado	58	80			
<b><math>\leq 17</math> años (total)</b>					
Vacunado	8	19	48.87	(0.20 – 1.28)	0.15
No vacunado	42	51			
<b><math>\geq 18</math> años (total)</b>					
Vacunado	24	51	14.71	(0.39 – 1.86)	0.68
No vacunado	16	29			

EV: efectividad de la vacuna; IC del 95%: intervalo de confianza del 95%.

Dividimos los casos positivos a influenza por tipos y subtipos, y encontramos que los virus predominantes fueron el subtipo A(H3N2), seguido de influenza B y subtipo A(H1N1). Los virus menos frecuentes fueron los que estaban en coinfección (subtipo A(H3N2) con

influenza B) y solo un paciente ambulatorio con virus influenza A no subtipificable (**Tabla 1 Suplementaria**).

La EV en este estudio fue mayor para el subtipo A(H1N1) para todas las edades y por grupo de edad en comparación con las coinfecciones de influenza A no subtipificable, influenza B, subtipo A(H3N2) y A/B. Por el contrario, las coinfecciones A/B y el subtipo A(H3N2) dieron como resultado la EV más baja. La EV en este estudio fue mayor para el subtipo A(H1N1) para todas las edades y por grupo de edad en comparación con las coinfecciones de influenza A no subtipificable, influenza B, subtipo A(H3N2) y A/B. Por el contrario, las coinfecciones A/B y el subtipo A (H3N2) dieron como resultado la EV más baja (**Tabla suplementaria 2**).

Luego dividimos los casos positivos de influenza A(H3N2) por clados y subclados, y encontramos una mayor circulación del clado 3C.2a2re, seguido de los clados 3C.2a2 y 3C.2a3. El clado 3C.2a1 y el subclado 3C.2a1b circularon menos, y el clado 3C.3a tuvo la circulación más baja absoluta (**Tabla suplementaria 3**). Se utilizaron números absolutos de casos y controles entre vacunados y no vacunados, divididos por tipos, subtipos, clados y subclados de influenza, para estimar la EV, lo que resultó no significativo en todos los análisis (**Tablas suplementarias 2 y 4**). Sin embargo, nuestras estimaciones de EV tendieron a ser más altas para el subtipo A(H1N1) en todas las edades y dentro de los grupos de edad ( $\leq 17$  años y  $\geq 18$  años) en comparación con la influenza A no subtipificable, la influenza B, el subtipo A(H3N2) y co-infecciones A/B.

El análisis multivariado mostró que el único factor asociado a la influenza fue el número de síntomas ( $p=0.0001$ ), pero el ajuste por comorbilidades no fue significativo (**tabla 3**). Para el análisis multivariado de influenza A(H3N2) frente a todos los tipos y subtipos de influenza ajustados por sexo, es el único que alcanza significación estadística ( $p=0.03$ ), mientras que ni la edad vacunal, número de síntomas, ni comorbilidades alcanzaron la significancia estadística (**tabla 4**).

**Tabla 3.- Variables asociadas con influenza**

Variable	Razón de momios ajustada	IC 95 %	P
Vacunados	0.73	(0.39-1.35)	0.09
Edad	1.00	(0.98-1.01)	0.80
Sexo	1.49	(0.83-2.66)	0.42
Número de síntomas	0.79	(0.71-0.87)	0.00
Número de comorbilidades	1.31	(0.78-2.19)	0.57

IC del 95%: intervalo de confianza del 95%.

**Tabla 4.- Influenza A(H3N2) asociada con todos los tipos y subtipos de influenza**

Variable	Razón de momios ajustada	IC 95 %	P
Vacunados	0.62	(0.19-1.98)	0.08
Edad	1.01	(0.98-1.04)	0.08
Sexo	2.33	(0.87-6.24)	0.03
Número de síntomas	0.93	(0.78-1.10)	0.65
Número de comorbilidades	0.79	(0.36-1.74)	0.60

IC del 95%: intervalo de confianza del 95%.

Todos los individuos del estudio vacunados contra influenza se presentaron en el hospital entre 36 y 91 días después de la inmunización, con síntomas de ESI. Los pacientes con una prueba RIDT positiva fueron tratados con oseltamivir; ninguno de los participantes del estudio requirió hospitalización.

### 5.3.- Análisis genético del gen HA

De los 90 casos, 61 dieron positivo a influenza A(H3N2). Casi la mitad de estos (30) tenían suficiente ácido nucleico para la amplificación, y por lo tanto, se amplificó su gen HA. La identidad de secuencia de nucleótidos de las muestras del estudio se dedujo a partir de la cepa de la vacuna A/Hong Kong/4801/2014. El árbol filogenético (**figura 7**) muestra dos secuencias de pacientes vacunados localizados dentro del clado 3C.3a con identidades del 97.45% al 97.65%, tres secuencias de pacientes vacunados se encuentran en el subclado 3C.2a1 con 98.10% al 98.29% de identidad, otras dos secuencias de pacientes vacunados y una de paciente no vacunado se localizan en el subclado 3C.2a1b con 98.25% al 98.29% de identidad, nueve secuencias de pacientes vacunados y nueve secuencias de pacientes no vacunados se ubicaron en el clado 3C.2a2 con 98.20% al 98.79% de identidad, una secuencia de paciente vacunado y tres de secuencias de individuos no vacunados se localizan en el clado 3C.2a3 con 98.54% al 98.73% de identidad, no se localizó ninguna secuencia de la cohorte mexicana en los clados 3C, 3C.1, 3C.2, 3C.3, o los subclados 3C.2a, 3C.2a4, 3C.2b y 3C.3a. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparados con lo reportado por los E.U.A. y Canadá, para lo cual, se alinearon 4011 secuencias de México, Canadá y EE UU de la temporada de influenza 2017-2018. El árbol filogenético generado con estas secuencias muestra una circulación mayoritaria de virus de influenza A(H3N2) clado 3C.2a2 (coincidiendo con lo observado en la **figura 7**), seguido del clado 3C.2a1 y el clado 3C.3a como el grupo minoritario.

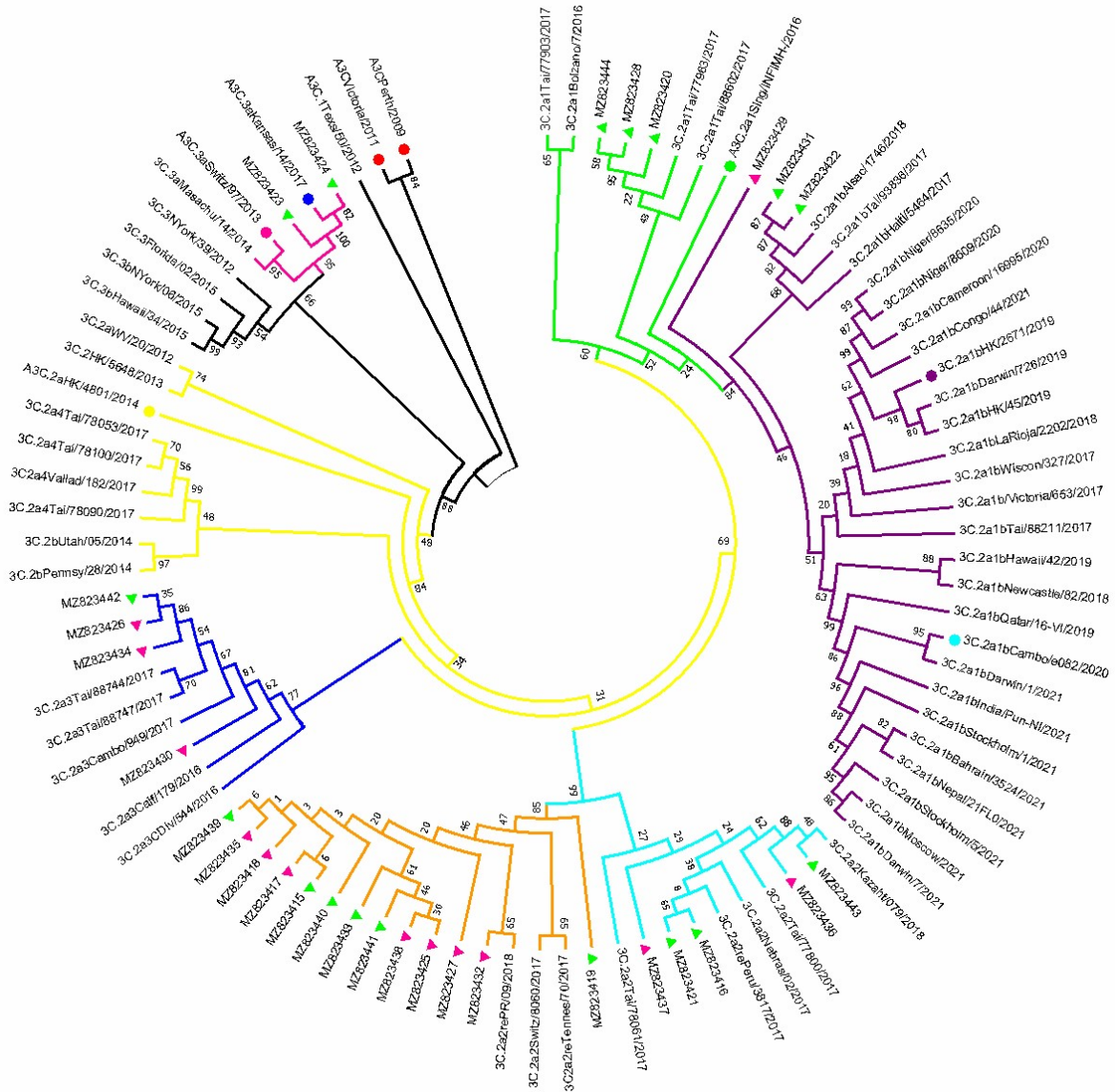


Figura 7. Árbol de máxima probabilidad basado en Hasegawa-Kishino-Yano para la hemaglutinina de los virus de influenza A(H3N2) mexicanos y virus de referencia. Virus clado 3C utilizado para las vacunas de las temporadas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013 (círculos rojos), virus clado 3C.1 utilizado para la vacuna de las temporadas 2013-2014 y 2014-2015 (círculo marrón), virus clado 3C.3a utilizado para la vacuna de la temporada 2015-2016 (círculo rosa), el virus del clado 3C.2a utilizado para las vacunas de las temporadas 2016-2017 y 2017-2018 (círculo amarillo), el virus del clado 3C.2a1 utilizado para la vacuna de la temporada 2018-2019 (círculo verde), el virus del clado 3C.3a virus utilizado para la vacuna de la temporada 2019-2020 (círculo morado), virus del clado 3C.3a utilizado para la vacuna de la temporada 2020-2021 (círculo azul oscuro) y virus del subclado 3C.2a1b utilizado para la vacuna de la temporada 2021-2022 (círculo azul claro). Destacamos las

ramas de los virus del clado 3C.3a (rosa) y las ramas de los virus del clado 3c.2a (amarillo), de los cuales los clados 3C.2a3 (azul marino), 3C.2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja) y 3C. 2a1 (verde) se derivan; finalmente, el subclado 3C.2a1 (púrpura) se deriva del clado 3C.2a1. Las muestras de pacientes ambulatorios mexicanos vacunados (triángulos verdes) y de pacientes no vacunados (triángulos rosas) están resaltadas y corresponden a estas secuencias en GenBank con números de acceso MZ823415-MZ823444.

#### **5.4.- Variaciones en los residuos de aminoácidos de HA**

Los cambios no sinónimos encontrados en las 30 muestras de pacientes ambulatorios vacunados y no vacunados se dedujeron de la cepa A/Hong Kong/4801/2014 (**Tabla suplementaria 5**). En el clado 3C.3a se encontraron cuatro cambios en los sitios antigénicos A y tres en B, mientras que la posición 144 agrega una firma de lisina que también coincide con un sitio de glicosilación. En el clado 3C.2a1 se encontraron tres cambios en los sitios antigénicos A, otros dos cambios en el sitio antigénico B, y tres firmas de lisina en las posiciones 121, 135 y 171. En el subclado 3C.2a1b, no hay cambios dentro del sitio antigénico A, solo en la posición adyacente 121 tenemos un cambio, se encontraron tres modificaciones en el sitio antigénico B, las posiciones 121 y 171 agregan dos firmas de lisina. En la mayoría del clado 3C.2a2re de los estudios, comparte dos cambios en el sitio antigénico A, dos en B y uno en E. También observamos un cambio en la posición S199P en cuatro muestras de mujeres. En el clado 3C.2a2, tenemos dos cambios en el sitio antigénico A, dos en B y uno en E. Las posiciones 131 y 142 agregan dos firmas de lisina, así como el sitio 131 con pérdida potencial de glicosilación. También observamos el cambio S198P solo en dos muestras. En el clado 3C.2a3, encontramos el cambio N121K adyacente al sitio antigénico A, y dentro de este, hay dos cambios en las posiciones 121, 135, 144 y 150, agregan cuatro firmas de lisina y dos sitios con pérdida potencial de glicosilación en las posiciones 135 y 144.

## 6.- Discusión

La eficacia de la vacuna administrada a principios de 2018 en la Ciudad de México disminuyó por efecto de la variación antigénica de los virus A(H3N2) co-circulantes. Este estudio retrospectivo demuestra una menor eficiencia de la vacuna contra la influenza asociada con la circulación de los virus con importantes diferencias antigénicas, no cubierta por la vacuna contemporánea en la Ciudad de México, durante la temporada de influenza 2017-2018.

Se seleccionó un diseño de estudio de casos y controles como el método óptimo para estimar la EV para influenza en esta población. Los grupos de casos y controles fueron similares entre sí en las variables demográficas y clínicas, con la única excepción del número de signos y síntomas. Encontramos la mayor proporción de signos y síntomas en el grupo de casos, lo que sugiere que la influenza causa una mayor cantidad de signos y síntomas en comparación con un grupo de control. El análisis multivariado confirmó que los signos y síntomas descritos estaban asociados a la infección gripal, aportando información útil para el diagnóstico clínico. Sin embargo, como los signos y síntomas también están relacionados con el COVID-19, se necesitan más y mejores herramientas diagnósticas para diferenciar entre influenza y COVID-19 (Castillejos et al., 2019).

Al analizar las comorbilidades no se observó correlación entre las comorbilidades y la influenza o el subtipo A(H3N2). Sin embargo, esto muy bien podría deberse al pequeño número de personas con comorbilidades en nuestro estudio. Las demás características demográficas analizadas no mostraron asociaciones con la influenza. En particular,

esperábamos que las variables de vacunación tuvieran una asociación negativa significativa con la influenza o que actuaran como un factor protector contra la infección. Sin embargo, en todos los análisis realizados con las variables de vacunas, no encontramos asociaciones positivas o negativas significativas con la influenza.

Otros autores observaron una disminución de la EV en el rango de 10% y 15% entre las temporadas de influenza 2016-2017 a 2017-2018, respectivamente, en EE. UU. y Europa. En las mismas temporadas de influenza en Canadá, los autores reportaron una disminución de la EV del 22% analizando únicamente el subtipo A(H3N2) (Flannery et al., 2017; Kissling et al., 2019b; Rolfes et al., 2019; Skowronski et al., 2020). Durante esas mismas temporadas de influenza, nuestros datos muestran un aumento del 3.75 % en la EV general, pero si observamos solo la EV para el subtipo A(H3N2), vemos una disminución del 23,91 % en la VE (Castillejos et al., 2019). Estos datos coinciden con los ajustes propuestos por la OMS y los cambios observados en el componente A(H3N2) de la vacuna para la siguiente temporada de influenza, reforzando la importancia del monitoreo año a año de los virus de influenza.

Los estudios que analizan la distancia antigénica entre los virus de la influenza brindan una forma de estudiar algunos de los mecanismos de protección de las vacunas y su relación con la evolución del virus. Todos los clados y subclados (3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2re, 3C.2a2 y 3C.2a3) de este estudio mostraron su distancia filogenética con respecto al clado 3C.2a del que derivaron. Este clado también fue el componente de la cepa vacunal aplicada a nuestra población de estudio. Estas distancias filogenéticas también fueron observadas por Jorquera y colabs, adicionalmente ellos analizaron las distancias antigénicas con sueros



de hurones inmunizados y corroboraron el escape inmunológico de los diversos clados y subclados circulando en la población. Por ejemplo, los virus del clado 3C.3a de este estudio mostraron una mayor distancia antigénica de los virus derivados del clado 3C.2a; y también mostraron una distancia antigénica del virus de la cepa vacunal. Cuanto mayor sea la distancia antigénica entre clados y/o subclados de influenza A(H3N2), mayor será la probabilidad de infección (Jorquera et al., 2019).

Las temporadas 2016-2017 y 2017-2018 en Norteamérica se caracterizaron por una circulación predominante de los clados 3C.2a1 y 3C.2a2re, respectivamente, coincidiendo también con el componente A/Hong Kong/4801/2014 en la composición de la vacuna (**Ver las Figuras complementarias 1a y 1b**). La siguiente temporada de influenza 2018-2019 se caracterizó por la introducción del virus A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 en los componentes de la vacuna y la circulación predominante del clado 3C.3a, seguido del subclado 3C.2a1b (**Ver la Figura complementaria 1c**). Finalmente, en la temporada de influenza 2019-2020, el virus A/Kansas/14/2017 se introdujo en los componentes de la vacuna y se observó la circulación predominante del subclado 3C.2a1b (**Ver la Figura complementaria 1d**). Los análisis filogenéticos para las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 (**Ver las Figuras complementarias 1c y 1d**) muestran una presión de selección sobre los virus de la influenza en América del Norte que coincide con los ajustes en los componentes de la vacuna contra la influenza. Los análisis antigénicos confirman el distanciamiento entre el clado 3C.3a y el subclado 3C.2a1b (Gouma et al, 2020; Jorquera et al., 2019), en consecuencia, limita la protección de las personas inmunizadas con estas vacunas, frente a la co-circulación de ambos virus.

Se implementaron medidas de salud pública sin precedentes al comienzo de la pandemia de COVID-19; estas medidas llevaron a una disminución dramática en la detección de influenza. Incluso se piensa que los virus de los linajes B/Yamagata se extinguieron a mediados de 2020 (Dhanasekaran et al., 2022;Gouma et al., 2020). Lo mismo parece haber ocurrido con los subclados derivados del clado 3C.2a (excepto 3C.2a1b) informados antes de la pandemia de COVID-19. Sin embargo, no está claro si estos clados y subclados aparentemente extintos del linaje A(H3N2) e influenza B reaparecerán y predominarán en futuras temporadas de influenza, con graves consecuencias. Por estas razones, es difícil hacer recomendaciones sobre los componentes de la vacuna contra la influenza A(H3N2) en el futuro. Idealmente, estas vacunas deberían tener antígenos tanto 3C.3a como 3C.2a1b, pero esto implica pasar de vacunas trivalentes y tetravalentes a vacunas pentavalentes, lo que podría no ser factible de inmediato ( Dhanasekaran et al., 2022; Gouma et al., 2020).

Proponemos establecer la fabricación y aplicación de vacunas pentavalentes basadas en embriones de pollo y/o el uso de vacunas de RNA para aumentar la EV en el futuro. También proponemos continuar fomentando la vacunación, dado el aumento en la aceptación e intención de vacunación contra la influenza después del COVID-19. Consideramos importante seguir promoviendo el lavado de manos, el uso de mascarillas y las medidas de distanciamiento social cada vez que se identifiquen brotes locales, porque estas medidas han demostrado ser efectivas en la prevención de la influenza y complementarias a la vacunación ( Bloom et al., 2021; Fernández-Rojas et al., 2021; Kong et al., 2022).

## 7.- Conclusiones

Las características de los pacientes ambulatorios analizados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto, no tuvimos sesgos por los criterios de inclusión utilizados.

Los análisis multivariados únicamente asociaron influenza con el número de síntomas, lo que resulta insuficiente como predictor de la influenza, además existen otros virus respiratorios que coinciden con los síntomas observados.

Las tendencias de la efectividad de la vacuna fueron bajas para toda la población de estudio (36.9%), pero resultado más alta en el grupo  $\leq 17$  años (48.9%) y menor en el grupo  $\geq 18$  años (14.7%), esto resulta útil para proponer cambios a los componentes de la vacuna y conocer las preferencias de vacunación entre los grupos de edad analizados.

Nuestro diseño experimental permitió atender oportunamente (tratamiento con oseltamivir) a individuos vacunados, y esto coincidió con nulas formas graves de la enfermedad en la población de estudio.

Las variantes genéticas de los virus de influenza A(H3N2) presentes en población mexicana a inicios de 2018, muestran identidades entre el 97.45% al 98.79% con respecto a la cepa vacunal, los análisis filogenéticos clasifican a estos virus dentro de los clados 3C.3a, 3C.2a3, 3C.2a2, 3C.2a2re, 3C.2a1 y el subclado 3C.2a1b.

Las sustituciones de aminoácidos en los virus A(H3N2) aislados de pacientes mexicanos utilizando a la cepa vacunal como referencia, nos permitió observar 5 fenotipos distintos que coinciden con cambios antigénicos que permiten la evasión a la respuesta inmunológica de pacientes vacunados.

La eficacia de la vacuna aplicada a inicios de 2018 en la Ciudad de México disminuyó por efecto de la variación antigénica de los virus A(H3N2) co-circulantes en la población.

## 8.- Referencias Bibliográficas

- Abente, E. J., Santos, J., Lewis, N. S., Gauger, P. C., Stratton, J., Skepner, E., Anderson, T. K., Rajao, D. S., Perez, D. R., & Vincent, A. L. (2016). The Molecular Determinants of Antibody Recognition and Antigenic Drift in the H3 Hemagglutinin of Swine Influenza A Virus. *Journal of Virology*, *90*(18), 8266–8280.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01002-16>
- Adi-Kusumo, F. (2017). The Dynamics of a SEIR–SIRC Antigenic Drift Influenza Model. *Bulletin of Mathematical Biology*, *79*(6), 1412–1425. <https://doi.org/10.1007/s11538-017-0290-5>
- Air, G. M., & Compans, R. W. (1983). Influenza B and Influenza C Viruses. *Genetics of Influenza Viruses*, 280. [http://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2016/03/Influenza-virus-C-IVC-and-influenza-virus-D-IVD.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-8706-7\\_9%5Cnfile:///Files/40/40ef82d4-988e-4267-abcd-62e1de171e7e.pdf%5Cnpapers3://publication/doi/10.1007/97](http://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2016/03/Influenza-virus-C-IVC-and-influenza-virus-D-IVD.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-8706-7_9%5Cnfile:///Files/40/40ef82d4-988e-4267-abcd-62e1de171e7e.pdf%5Cnpapers3://publication/doi/10.1007/97)
- Alejandra, L., Carlos, F. J., Nereyda, D. J., Gerardo, S., Verónica, V., Nora, R., Sandra, R., Irma, H., & Julio, R. (2014). Transfection of influenza A virus nuclear export protein induces the expression of tumor necrosis factor alpha. *Virus Research*, *185*, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.011>
- Allen, J. D., & Ross, T. M. (2018). H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *14*(8), 1840–1847. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1462639>
- Altman, M. O., Angeletti, D., & Yewdell, J. W. (2018a). Antibody Immunodominance: The

- Key to Understanding Influenza Virus Antigenic Drift. *Viral Immunology*, 31(2), vim.2017.0129. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0129>
- Altman, M. O., Angeletti, D., & Yewdell, J. W. (2018b). Antibody Immunodominance: The Key to Understanding Influenza Virus Antigenic Drift. *Viral Immunology*, 31(2), vim.2017.0129. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0129>
- Alvarado-Facundo, E., Gao, Y., Ribas-Aparicio, R. M., Jiménez-Alberto, A., Weiss, C. D., & Wang, W. (2015). Influenza Virus M2 Protein Ion Channel Activity Helps To Maintain Pandemic 2009 H1N1 Virus Hemagglutinin Fusion Competence during Transport to the Cell Surface. *Journal of Virology*, 89(4), 1975–1985. <https://doi.org/10.1128/JVI.03253-14>
- Arias, C. F., Escalera-Zamudio, M., de los Dolores Soto-Del Río, M., Georgina Cobián-Güemes, A., Isa, P., & López, S. (2009). Molecular Anatomy of 2009 Influenza virus A (H1N1). *Archives of Medical Research*, 40(8), 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2009.10.007>
- Arns, Steve; Balgi, Aruna D; Schimizu, Yoko; Pfeiter, Tom A; Kumar, Nag; Schidmoosavee, F. S. (1997). Novel spirothiazamenthane inhibitors of the influenza A M2 proton channel. *Crystallography Reports*, 42(2), 269–272. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.008>
- Asha, K., & Kumar, B. (2019). Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 192. <https://doi.org/10.3390/jcm8020192>
- Ayora-Talavera, G. (2018). *Sialic acid receptors : focus on their role in influenza infection*.
- Ayora-Talavera, G., Flores, G. M. Z., Gómez-Carballo, J., González-Losa, R., Conde-Ferraez, L., Puerto-Solís, M., López-Martínez, I., Díaz-Quiñonez, A., Barrera-Badillo, G., Acuna-Soto, R., Livinski, A. A., & Alonso, W. J. (2017). Influenza seasonality

goes south in the Yucatan Peninsula: The case for a different influenza vaccine calendar in this Mexican region. *Vaccine*, 35(36), 4738–4744.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.020>

Bansal A, Trieu M-C, Mohn KGI and Cox RJ (2021) Safety, Immunogenicity, Efficacy and Effectiveness of Inactivated Influenza Vaccines in Healthy Pregnant Women and Children Under 5 Years: An Evidence-Based Clinical Review. *Front. Immunol.* 12:744774. doi: 10.3389/fimmu.2021.744774

Batishchev, O. V., Shilova, L. A., Kachala, M. V., Tashkin, V. Y., Sokolov, V. S., Fedorova, N. V., Baratova, L. A., Knyazev, D. G., Zimmerberg, J., & Chizmadzhev, Y. A. (2016). pH-Dependent Formation and Disintegration of the Influenza A Virus Protein Scaffold To Provide Tension for Membrane Fusion. *Journal of Virology*, 90(1), 575–585. <https://doi.org/10.1128/JVI.01539-15>

Beigel, J. H., Bao, Y., Beeler, J., Manosuthi, W., Slandzicki, A., Dar, S. M., Panuto, J., Beasley, R. L., Perez-Patrigion, S., Suwanpimolkul, G., Losso, M. H., McClure, N., Bozzolo, D. R., Myers, C., Holley, H. P., Hoopes, J., Lane, H. C., Hughes, M. D., Davey, R. T., ... Alzogaray, M. F. (2017). Oseltamivir, amantadine, and ribavirin combination antiviral therapy versus oseltamivir monotherapy for the treatment of influenza: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), 1255–1265. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30476-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30476-0)

Belderok, S. M., Rimmelzwaan, G. F., van den Hoek, A., & Sonder, G. J. B. (2013). Effect of travel on influenza epidemiology. *Emerging Infectious Diseases*, 19(6), 925–931. <https://doi.org/10.3201/eid1906.111864>

Benton, D. J., Nans, A., Calder, L. J., Turner, J., Neu, U., Lin, Y. P., Ketelaars, E., Kallewaard, N. L., Corti, D., Lanzavecchia, A., Gamblin, S. J., Rosenthal, P. B., &

- Skehel, J. J. (2018). Influenza hemagglutinin membrane anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201810927. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810927115>
- Beyer, W. E. P., Palache, A. M., Boulfich, M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2017). Rationale for two influenza B lineages in seasonal vaccines: A meta-regression study on immunogenicity and controlled field trials. *Vaccine*, 35(33), 4167–4176. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.038>
- Bian, J. R., Nie, W., Zang, Y. S., Fang, Z., Xiu, Q. Y., & Xu, X. X. (2014). Clinical aspects and cytokine response in adults with seasonal influenza infection. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(12), 5593–5602.
- Bodewes, R., Morick, D., de Mutsert, G., Osinga, N., Bestebroer, T., van der Vliet, S., Smits, S. L., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A. M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2013). Recurring influenza B virus infections in seals. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 511–512. <https://doi.org/10.3201/eid1903.120965>
- Cady, Sarah D; Lou, Wenbin; Hu, Fanghao; Hong, M. (2010). NIH Public Access. *Changes*, 38(3), 319–335. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125627.Brain>
- Castillejos, M., Cabello-Gutiérrez, C., Alberto Choreño-Parra, J., Hernández, V., Romo, J., Hernández-Sánchez, F., Martínez, D., Hernández, A., Jiménez-Álvarez, L., Hernández-Cardenas, C. M., Becerril-Vargas, E., Martínez-Orozco, J. A., Luis Sandoval-Gutiérrez, J., Guadarrama, C., Olvera-Masetto, E., Alfaro-Ramos, L., Cruz-Lagunas, A., Ramírez, G., Márquez, E., ... Zúñiga, J. (2019). High performance of rapid influenza diagnostic test and variable effectiveness of influenza vaccines in Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*, 89, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.029>



CDC. (2019a). *Key Facts About Influenza (Flu)*.

<https://www.cdc.gov/flu/about/keyfacts.htm>

CDC. (2019b). *Influenza Historic Timeline*. <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/pandemic-timeline-1930-and-beyond.htm>

CDC. (2021a). *Flu Symptoms & Complications*.

<https://www.cdc.gov/flu/symptoms/symptoms.htm>

CDC. (2021b). How Influenza (Flu) Vaccines Are Made.  
<https://www.cdc.gov/flu/prevent/how-fluvaccine-made.htm>

Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *How the Flu Virus Can Change:*

*“Drift” and “Shift.”* <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>

Chaipan, C., Kobasa, D., Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Solomon Tsegaye, T.,

Takeda, M., Bugge, T. H., Kim, S., Park, Y., Marzi, A., & Pohlmann, S. (2009).

Proteolytic Activation of the 1918 Influenza Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 83(7), 3200–3211. <https://doi.org/10.1128/JVI.02205-08>

Chen, J. (2018). *Host immune Response to influenza A virus infection*. 9(March), 1–13.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>

Cobey, S., & Hensley, S. E. (2017). ScienceDirect Immune history and influenza virus

susceptibility. *Current Opinion in Virology*, 22, 105–111.

<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.12.004>

da Silva, D. V., Nordholm, J., Dou, D., Wang, H., Rossman, J. S., & Daniels, R. (2015).

The Influenza Virus Neuraminidase Protein Transmembrane and Head Domains Have Coevolved. *Journal of Virology*, 89(2), 1094–1104.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02005-14>

- de la Rosa-Zamboni, D., Vázquez-Pérez, J. A., Ávila-Ríos, S., Carranco-Arenas, A. P., Ormsby, C. E., Cummings, C. A., Soto-Nava, M., Hernández-Hernández, V. A., Orozco-Sánchez, C. O., la Barrera, C. A. de, Pérez-Padilla, R., & Reyes-Terán, G. (2012). Molecular Characterization of the Predominant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Mexico, December 2011-February 2012. *PLoS ONE*, 7(11).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050116>
- DGE. (2017). *Información Semanal* □ *Casos de IRA Casos de Neumonía / Bronconeumonía 2017*.
- DGE. (2018). *Evento Información Semanal* □ *Casos de IRA Casos de Neumonía / Bronconeumonía 2018. 2018*.
- Dhand, R., & Li, J. (2020). Coughs and Sneezes: Their Role in Transmission of Respiratory Viral Infections, including SARS-CoV-2. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 202(5), 651–659. <https://doi.org/10.1164/rccm.202004-1263PP>
- Domínguez, A., Soldevila, N., Toledo, D., Godoy, P., Espejo, E., Fernandez, M. A., Mayoral, J. M., Castilla, J., & Egurrola, M. (2014). *The effectiveness of influenza vaccination in preventing hospitalisations of elderly individuals in two influenza seasons : a multicentre case – control study , Spain , 2013 / 14*. 1–8.
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., & Daniels, R. (2018). Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in Immunology*, 9(JUL), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>
- Dyer, R. B., & Eller, M. W. (2018). Dynamics of hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201811183. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811183115>

- Eichelberger, M. C., Morens, D. M., & Taubenberger, J. K. (2018). ScienceDirect  
Neuraminidase as an influenza vaccine antigen : a low hanging fruit , ready for picking  
to improve vaccine effectiveness. *Current Opinion in Immunology*, 53, 38–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.025>
- Eiros, J. M., Ortiz De Lejarazu, R., Tenorio, A., Casas, I., Pozo, F., Ruiz, G., & Pérez-  
Breña, P. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias.  
*Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(3), 168–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.03.004>
- Epidemiología, S. de S. y D. G. de E. (2020). *Informes Semanales para la Vigilancia  
Epidemiológica*.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/603812/INFLUENZA\\_SE53\\_2020.  
pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/603812/INFLUENZA_SE53_2020.pdf)
- Ferhadian, D., Contrant, M., Printz-Schweigert, A., Smyth, R. P., Paillart, J. C., & Marquet,  
R. (2018). Structural and functional motifs in influenza virus RNAs. *Frontiers in  
Microbiology*, 9(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00559>
- Forthal, D. N. (2014). *Functions of Antibodies*. 2(4), 1–17.
- Fujioka, Y., Nishide, S., Ose, T., Suzuki, T., Kato, I., Fukuhara, H., Fujioka, M., Horiuchi,  
K., Satoh, A. O., Nepal, P., Kashiwagi, S., Wang, J., Horiguchi, M., Sato, Y., Paudel,  
S., Nanbo, A., Miyazaki, T., Hasegawa, H., Maenaka, K., & Ohba, Y. (2018). A  
Sialylated Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup>Channel Binds Hemagglutinin and Mediates  
Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host and Microbe*, 23(6), 809-  
818.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.015>
- Goeijenbier, M., van Genderen, P., Ward, B. J., Wilder-Smith, A., Steffen, R., &  
Osterhaus, A. D. M. E. (2017). Travellers and influenza: risks and prevention. *Journal*

*of Travel Medicine*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/jtm/taw078>

Gomez-Barroso, D., León-Gómez, I., Delgado-Sanz, C., & Larrauri, A. (2017). Climatic factors and influenza transmission, Spain, 2010–2015. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12).

<https://doi.org/10.3390/ijerph14121469>

Gregory, V., Daniels, R., & McCauley, J. (2017). Antigenic and genetic characterization of influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2015/2016 season. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.027>

Halldorsson, S., Sader, K., Turner, J., Calder, L. J., & Rosenthal, P. B. (2021). In situ structure and organization of the influenza C virus surface glycoprotein. *Nature Communications*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21818-9>

Harris, A. K., Meyerson, J. R., Matsuoka, Y., Kuybeda, O., Moran, A., Bliss, D., Das, S. R., Yewdell, J. W., Sapiro, G., Subbarao, K., & Subramaniam, S. (2013). Structure and accessibility of HA trimers on intact 2009 H1N1 pandemic influenza virus to stem region-specific neutralizing antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4592–4597.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1214913110>

Henry, C., Palm, A. E., Krammer, F., & Wilson, P. C. (2018). From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine. *Trends in Immunology*, 39(1), 70–79.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.003>

Hong, S., Zhang, Z., Liu, H., Tian, M., Zhu, X., Zhang, Z., & Wang, W. (2018). Article B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4 + T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen Article B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4 + T Cells upon

- Immuni. *Immunity*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.012>
- Hutchinson, E. C., Charles, P. D., Hester, S. S., Thomas, B., Trudgian, D., Martínez-Alonso, M., & Fodor, E. (2015). Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nature Communications*, 5(May).  
<https://doi.org/10.1038/ncomms5816>
- Ignacio-Santos, J. (2002). El Programa Nacional de Vacunación: orgullo de México. *Rev Fac Med UNAM Vol.45 No.3*.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2002/un023g.pdf>
- Jacob, A., Sood, R., Chanu, K. V., Bhatia, S., Khandia, R., Pateriya, A. K., Nagarajan, S., Dimri, U., & Kulkarni, D. D. (2016). Amantadine resistance among highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) isolated from India. *Microbial Pathogenesis*, 91, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.008>
- Jegaskanda, S. (2018). *The Potential Role of Fc-Receptor Functions in the*.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines6020027>
- Jones, D. D., Wilmore, J. R., & Allman, D. (2016). *Cellular Dynamics of Memory B Cell Populations: IgM+ and IgG+ Memory B Cells Persist Indefinitely as Quiescent Cells*. 195(10), 4753–4759. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501365>. Cellular
- Jorquera, P. A., Mishin, V. P., Chesnokov, A., Nguyen, H. T., Mann, B., Garten, R., Barnes, J., Hodges, E., De La Cruz, J., Xu, X., Katz, J., Wentworth, D. E., & Gubareva, L. V. (2019). Insights into the antigenic advancement of influenza A(H3N2) viruses, 2011–2018. *Scientific Reports*, 9(1), 2011–2018.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39276-1>
- Ju. (2017). Long noncoding RNA ADAMTS9-AS2 is regulated by DNA methyltransferase 1 and inhibits the malignant behaviors of non-small cell lung cancer cells.

*International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(3), 2599–2608.

<https://doi.org/10.1002/jmv>

Khordori, N. M. (2010). Clinical Aspects of Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection. *Yearbook of Medicine*, 2010, 83–84. [https://doi.org/10.1016/s0084-3873\(10\)79684-x](https://doi.org/10.1016/s0084-3873(10)79684-x)

Killip, M. J., Fodor, E., & Randall, R. E. (2015). Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Research*, 209, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.003>

Kissling, E., Pozo, F., Buda, S., Gherasim, A., Brytting, M., & Domegan, L. (2018). Low 2018 / 19 vaccine effectiveness against influenza A ( H3N2 ) among 15 – 64-year-olds in Europe : exploration by birth cohort. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 1–12.

Kissling, E., Pozo, F., Buda, S., Vilcu, A. M., Rizzo, C., Gherasim, A., Horváth, J. K., Brytting, M., Domegan, L., Meijer, A., Paradowska-Stankiewicz, I., Machado, A., Vučina, V. V., Lazar, M., Johansen, K., Dürrwald, R., van der Werf, S., Bella, A., Larrauri, A., ... Valenciano, M. (2019). Effectiveness of influenza vaccine against influenza A in Europe in seasons of different A(H1N1)pdm09 and the same A(H3N2) vaccine components (2016–17 and 2017–18). *Vaccine: X*, 3.

<https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2019.100042>

Kolls, J. K., & Evans, S. E. (2017). *Lung epithelial cells : therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense*. December 2016, 1–14.

<https://doi.org/10.1038/mi.2017.71>

Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–21.

<https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>

- Lackenby, A., Besselaar, T. G., Daniels, R. S., Fry, A., Gregory, V., Gubareva, L. V., Huang, W., Hurt, A. C., Leang, S. K., Lee, R. T. C., Lo, J., Lollis, L., Maurer-Stroh, S., Odagiri, T., Pereyaslov, D., Takashita, E., Wang, D., Zhang, W., & Meijer, A. (2018). Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. *Antiviral Research*, *157*(June), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.001>
- Lawyer, G. (2016). Measuring the potential of individual airports for pandemic spread over the world airline network. *BMC Infectious Diseases*, *16*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1350-4>
- Lazniewski, M., Dawson, W. K., & Szczepi, T. (2018). OUP accepted manuscript. *Work, Aging and Retirement*, 1–13. <https://doi.org/10.11821/dlxb201802008>
- LeBouder, F., Lina, B., Rimmelzwaan, G. F., & Riteau, B. (2010). Plasminogen promotes influenza A virus replication through an annexin 2-dependent pathway in the absence of neuraminidase. *Journal of General Virology*, *91*(11), 2753–2761. <https://doi.org/10.1099/vir.0.023804-0>
- Li, S., Sieben, C., Ludwig, K., Höfer, C. T., Chiantia, S., Herrmann, A., Eghiaian, F., & Schaap, I. A. T. (2014). PH-ontrolled two-step uncoating of influenza virus. *Biophysical Journal*, *106*(7), 1447–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.02.018>
- Li, X., Gu, M., Zheng, Q., Gao, R., & Liu, X. (2021). Packaging signal of influenza A virus. *Virology Journal*, *18*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01504-4>
- Long, J. S., Mistry, B., Haslam, S. M., & Barclay, W. S. (2019). Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(2), 67–81. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0115-z>

- Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J., & Palese, P. (2007). Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathogens*, 3(10), 1470–1476.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030151>
- Macías-Hernández, Alejandro E., Solórzano-Santos, Fortino., Aguilar-Velasco, Hugo M., Ávila-Agüero, María L., Bazzino-Rubio, Fernando., Junqueira-Bellei, Nancy C., Bonvehí, Pablo E... Ruiz-Palacios y Santos, Guillermo M. (2017). Influenza tetravalent vaccines in national immunization programs for Latin-American countries. *ENF INF MICROBIOL 2020 40 (3): 92-99*. vol. 40, núm.3.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2020/ei203e.pdf>
- Manzoor, R., Igarashi, M., & Takada, A. (2017). Influenza A virus M2 protein: Roles from ingress to egress. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 1–16.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18122649>
- Marshall, N., Priyamvada, L., Ende, Z., Steel, J., & Lowen, A. C. (2013). Influenza Virus Reassortment Occurs with High Frequency in the Absence of Segment Mismatch. *PLoS Pathogens*, 9(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003421>
- Martyna, A., & Rossman, J. (2014). Alterations of membrane curvature during influenza virus budding. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1425–1428.  
<https://doi.org/10.1042/BST20140136>
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., & Klenk, H.-D. (2004). Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*, 78(22), 12665–12667.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004>
- Maurer, M. A., Meyer, L., Bianchi, M., Ward, A. B., Crispin, M., Hangartner, L., Maurer, M. A., Meyer, L., Bianchi, M., Turner, H. L., Le, N. P. L., & Steck, M. (2018).



Glycosylation of Human IgA Directly Inhibits Influenza A and Other Sialic-Acid-Binding Viruses Article Glycosylation of Human IgA Directly Inhibits Influenza A and Other Sialic-Acid-Binding Viruses. *CellReports*, 23(1), 90–99.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.027>

McKinley, T. J., Murcia, P. R., Gog, J. R., Varela, M., & Wood, J. L. N. (2011). A bayesian approach to analyse genetic variation within RNA viral populations. *PLoS Computational Biology*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002027>

Melidou, A., & Broberg, E. (2017). Predominance of influenza A(H3N2) virus genetic subclade 3C.2a1 during an early 2016/17 influenza season in Europe – Contribution of surveillance data from World Health Organization (WHO) European Region to the WHO vaccine composition consultation for nor. *Vaccine*, 35(37), 4828–4835.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.057>

Memoli, M. J., Athota, R., Reed, S., Czajkowski, L., Bristol, T., Proudfoot, K., Hagey, R., Voell, J., Fiorentino, C., Ademposi, A., Shoham, S., & Taubenberger, J. K. (2014). The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. *Clinical Infectious Diseases*, 58(2), 214–224.

<https://doi.org/10.1093/cid/cit725>

Monamele, G. C., Vernet, M. A., Nsaibirni, R. F. J., Bigna, J. J. R., Kenmoe, S., Njankouo, M. R., & Njouom, R. (2017). Associations between meteorological parameters and influenza activity in a subtropical country: Case of five sentinel sites in Yaoundé-Cameroon. *PLoS ONE*, 12(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186914>

Mulpuru, S., Li, L., Ye, L., Hatchette, T., Andrew, M. K., Ambrose, A., Boivin, G., Bowie, W., Chit, A., Santos, G. Dos, Elsherif, M., Green, K., Haguinet, F., Halperin, S. A., Ibarguchi, B., Johnstone, J., Katz, K., Langley, J. M., Leblanc, J., ... Trottier, S.

- (2019). *Effectiveness of Influenza Vaccination on Hospitalizations and Risk Factors for Severe Outcomes in Hospitalized Patients With COPD*. *155*(1), 69–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.044>
- Nachbagauer, R., & Krammer, F. (2018). *Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies*. *23*(4), 222–228.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.02.009>.Universal
- Núñez, I. A., Carlock, M. A., Allen, J. D., Owino, S. O., Moehling, K. K., Nowalk, P., Susick, M., Diagle, K., Sweeney, K., Mundle, S., Vogel, T. U., Delagrave, S., Ramgopal, M., Zimmerman, R. K., Kleanthous, H., & Ross, T. M. (2017). Impact of age and pre-existing influenza immune responses in humans receiving split inactivated influenza vaccine on the induction of the breadth of antibodies to influenza A strains. *PLoS ONE*, *12*(11), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185666>
- Paget, J., Spreuwenberg, P., Charu, V., Taylor, R. J., & Iuliano, A. D. (2019). *Global mortality associated with seasonal influenza epidemics : New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project*. *9*(2), 1–12.  
<https://doi.org/10.7189/jogh.09.020421>
- Pan, M., & Lednicky, J. A. (2019). *Collection , particle sizing and detection of airborne viruses*. <https://doi.org/10.1111/jam.14278>
- Parrish, C. R., Murcia, P. R., & Holmes, E. C. (2015). Influenza Virus Reservoirs and Intermediate Hosts: Dogs, Horses, and New Possibilities for Influenza Virus Exposure of Humans. *Journal of Virology*, *89*(6), 2990–2994.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.03146-14>
- Petrova, V. N., & Russell, C. A. (2018a). The evolution of seasonal influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(1), 47–60. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>

- Petrova, V. N., & Russell, C. A. (2018b). The evolution of seasonal influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 47–60. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>
- Pielak, R. M., & Chou, J. J. (2011). Influenza M2 proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(2), 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.04.015>
- Pizzolla, A., Smith, J. M., Brooks, A. G., & Reading, P. C. (2017). *Pattern recognition receptor immunomodulation of innate immunity as a strategy to limit the impact of influenza virus*. 101(January), 1–12. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0716-290R>
- Potter, B. I., Kondor, R., Hadfield, J., Huddleston, J., Barnes, J., Rowe, T., Guo, L., Xu, X., Neher, R. A., Bedford, T., & Wentworth, D. E. (2019). Evolution and rapid spread of a reassortant A(H3N2) virus that predominated the 2017–2018 influenza season. *Virus Evolution*, 5(2). <https://doi.org/10.1093/ve/vez046>
- Prandoni, P., Piovela, C., Spiezia, L., Dalla, F., & Pesavento, V. R. (2012). The optimal duration of anticoagulation in patients with venous thromboembolism: How long is long enough? *Panminerva Medica*, 54(1), 39–44. <https://doi.org/10.1007/5584>
- Richard, M., Herfst, S., Tao, H., Jacobs, N. T., & Lowen, A. C. (2017). Influenza A virus reassortment is limited by anatomical compartmentalization following co-infection via distinct routes. *Journal of Virology*, JVI.02063-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02063-17>
- Rivas-Santiago, Bruno Tonatiuh; Torres Rojas, MArtha; Bobadilla Lozoya, Karen y Sada Diaz, E. (2005). *edigraphic.com*. 18.
- Rogelio Perez-Padilla, M.D., Daniela de la Rosa-Zamboni, M. D., Samuel Ponce de Leon, M.D., Mauricio Hernandez, M. D., Francisco Quiñones-Falconi, M.D., Edgar Bautista, M. D., Alejandra Ramirez-Venegas, M.D., Jorge Rojas-Serrano, M. D., Christopher E.

- Ormsby, M.Sc., Ariel Corrales, M.D., Anjarath Higuera, M. D., Edgar Mondragon, M.D., and Jose Angel Cordova-Villalobos, M. D., & Influenza, for the I. W. G. on. (2009). *Pneumonia and Respiratory Failure from Swine-Origin Influenza A (H1N1) in Mexico*.
- Rose, A. M. C., Kissling, E., Gherasim, A., Casado, I., Bella, A., Launay, O., Lazăr, M., Marbus, S., Larrauri, A., Castilla, J., Alfonsi, V., Galtier, F., Ivanciuc, A., Meijer, A., Mickiene, A., Ikonen, N., Gómez, V., Lovrić, Z., Alain, M., & Marta, M. (2020). *Vaccine effectiveness against influenza A ( H3N2 ) and B among laboratory-confirmed , hospitalised older adults , Europe , 2017- 18 : A season of B lineage mismatched to the trivalent vaccine. December 2019, 302–310. <https://doi.org/10.1111/irv.12714>*
- Rossmann, J. S., & Lamb, R. A. (2011). *Influenza Virus Assembly and Budding. 411(2), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>*.Influenza
- Russell, C. J., Hu, M., & Okda, F. A. (2018). Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends in Microbiology, 26(10), 841–853. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.03.005>*
- Santner, P., Martins, J. M. da S., Laursen, J. S., Behrendt, L., Riber, L., Olsen, C. A., Arkin, I. T., Winther, J. R., Willemoës, M., & Lindorff-Larsen, K. (2018). A robust proton flux (pHlux) assay for studying function and inhibition of the Influenza A M2 proton channel. *Biochemistry, acs.biochem.8b00721. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00721>*
- Saunders-Hastings, P., & Krewski, D. (2016). Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens, 5(4), 66. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040066>*
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S. et al. (2006). *Influenza virus receptors in the human*

*airway*. 440(March), 435–436. <https://doi.org/10.1038/440435a>

- Skowronski, D. M., Chambers, C., De Serres, G., Dickinson, J. A., Winter, A. L., Hickman, R., Chan, T., Jassem, A. N., Drews, S. J., Charest, H., Gubbay, J. B., Bastien, N., Li, Y., & Krajdén, M. (2018). Early season co-circulation of influenza a(H3N2) and b(yamagata): Interim estimates of 2017/18 vaccine effectiveness, Canada, january 2018. *Eurosurveillance*, 23(5), 1–7. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.5.18-00035>
- Smith, G. J. D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., Ma, S. K., Cheung, C. L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J. S. M., Guan, Y., & Rambaut, A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza a epidemic. *Nature*, 459(7250), 1122–1125. <https://doi.org/10.1038/nature08182>
- Soebiyanto, R. P., Clara, W. A., Jara, J., Balmaseda, A., Lara, J., Moya, M. L., Palekar, R., Widdowson, M. A., Azziz-Baumgartner, E., & Kiang, R. K. (2015). Associations between seasonal influenza and meteorological parameters in Costa Rica, Honduras and Nicaragua. *Geospatial Health*, 10(2), 144–151. <https://doi.org/10.4081/gh.2015.372>
- Soto-nava, M., Avila-ríos, S., Valenzuela-ponce, H., García-morales, C., Carlson, J. M., Tapia-trejo, D., Garrido-rodriguez, D., Alva-hernández, S. N., García-tellez, T. A., Murakami-ogasawara, A., Hiv, I., Collaborative, A., Mallal, S. A., & John, M. (2018). *crossm Weaker HLA Footprints on HIV in the Unique and Highly Genetically Admixed Host Population of Mexico*. 1–24.
- Staneková, Z., & Vare, E. (2010). *Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. Figure 1*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-351>

- Stauffer, S., Feng, Y., Nebioglu, F., Heilig, R., Picotti, P., & Helenius, A. (2014). Stepwise Priming by Acidic pH and a High K<sup>+</sup> Concentration Is Required for Efficient Uncoating of Influenza A Virus Cores after Penetration. *Journal of Virology*, 88(22), 13029–13046. <https://doi.org/10.1128/JVI.01430-14>
- Stubbs, T. M., & Te Velthuis, A. J. W. (2014). The RNA-dependent RNA polymerase of the influenza A virus. *Future Virology*, 9(9), 863–876. <https://doi.org/10.2217/fvl.14.66>
- Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., & Veit, M. (2017). Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, 8(8), 1580–1591. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216>
- Suntronwong, N., Klinfueng, S., Vichiwattana, P., Korkong, S., Thongmee, T., Vongpunsawad, S., & Poovorawan, Y. (2017). Genetic and antigenic divergence in the influenza A(H3N2) virus circulating between 2016 and 2017 in Thailand. *PLoS ONE*, 12(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189511>
- Suptawiwat, O., Ninpan, K., Boonarkart, C., Ruangrung, K., & Auewarakul, P. (2017). Evolutionary dynamic of antigenic residues on influenza B hemagglutinin. *Virology*, 502(December 2016), 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.015>
- Suzuki, Y., & Nei, M. (2000). *Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes*. 1, 501–509.
- Tellier, R., Li, Y., Cowling, B. J., & Tang, J. W. (2019). *Recognition of aerosol transmission of infectious agents : a commentary*. 1–9.
- Tregoning, J. S., Russell, R. F., & Kinnear, E. (2017). *Adjuvanted influenza vaccines*. 5515(December). <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1415684>
- Trieu, M. C., Jul-Larsen, Å., Sævik, M., Madsen, A., Nøstbakken, J. K., Zhou, F., Skrede,

- S., & Cox, R. J. (2019). Antibody Responses to Influenza A/H1N1pdm09 Virus after Pandemic and Seasonal Influenza Vaccination in Healthcare Workers: A 5-Year Follow-up Study. *Clinical Infectious Diseases*, 68(3), 382–392.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciy487>
- Tsou, T. P., Su, C. P., Huang, W. T., Yang, J. R., & Liu, M. T. (2017). Influenza a(H3n2) virus variants and patient characteristics during a summer influenza epidemic in Taiwan, 2017. *Eurosurveillance*, 22(50), 1–6. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.17-00767>
- Wang, W., Defeo, C. J., Alvarado-facundo, E., Vassell, R., & Weiss, C. D. (2015). *Intermonomer Interactions in Hemagglutinin Subunits HA1 and HA2 Affecting Hemagglutinin Stability and Influenza Virus Infectivity*. 89(20).  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00939-15>
- Wei, C.J., Crank, M.C., Shiver, J. et al. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 19, 239–252 (2020).  
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0056-x>
- Wenjun Ma<sup>1</sup>, R. E. K. and J. A. R. (2008). Avian influenza: Straight from the dragon’s mouth. *Nature China*, 3(1), 158–166.  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nchina.2008.185%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/nchina.2008.185>
- WHO. (2019). *Global Influenza Strategy 2019-2030*. 0–1.
- Widdowson, M. A., Bresee, J. S., & Jernigan, D. B. (2017). The global threat of animal influenza viruses of zoonotic concern: Then and now. *Journal of Infectious Diseases*, 216(Suppl 4), S493--S498. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix331>
- Wilcox, T., & Hirshkowitz, A. (2015). *NIH Public Access*. 85(0 1), 1–27.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>. The
- Williams, J. K., Shcherbakov, A. A., Wang, J., & Hong, M. (2017). Protonation equilibria and pore-opening structure of the dual-histidine influenza B virus M2 transmembrane proton channel from solid-state NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 292(43), 17876–17884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813998>
- Wise, J. (2018). Trivalent flu vaccine won't protect against influenza B strain predominantly circulating. *Bmj*, 78(January), k78. <https://doi.org/10.1136/bmj.k78>
- Wohlgemuth, N., Lane, A. P., & Pekosz, A. (2018). Influenza A virus M2 protein apical targeting is required for efficient virus replication. *Journal of Virology*, August. <https://doi.org/10.1128/JVI.01425-18>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2006). Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: Zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 401–407. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244043.08264.fc>
- Xu, K., Li, C., Gravel, C., Jiang, Z., Jaentschke, B., Van Domselaar, G., Li, X., & Wang, J. (2018). Universal type/subtype-specific antibodies for quantitative analyses of neuraminidase in trivalent influenza vaccines. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18663-6>
- Yang, J. R., Hsu, S. Z., Kuo, C. Y., Huang, H. Y., Huang, T. Y., Wang, H. C., & Liu, M. T. (2018). An epidemic surge of influenza A(H3N2) virus at the end of the 2016–2017 season in Taiwan with an increased viral genetic heterogeneity. *Journal of Clinical Virology*, 99–100(161), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.12.012>
- Yang, X., Steukers, L., Forier, K., Xiong, R., Braeckmans, K., Van Reeth, K., & Nauwynck, H. (2014). A beneficiary role for neuraminidase in influenza virus



penetration through the respiratory mucus. *PLoS ONE*, 9(10), 1–11.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110026>

York, I. A., Stevens, J., & Alymova, I. V. (2019). Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Bioscience Reports*, 39(1), 1–15.

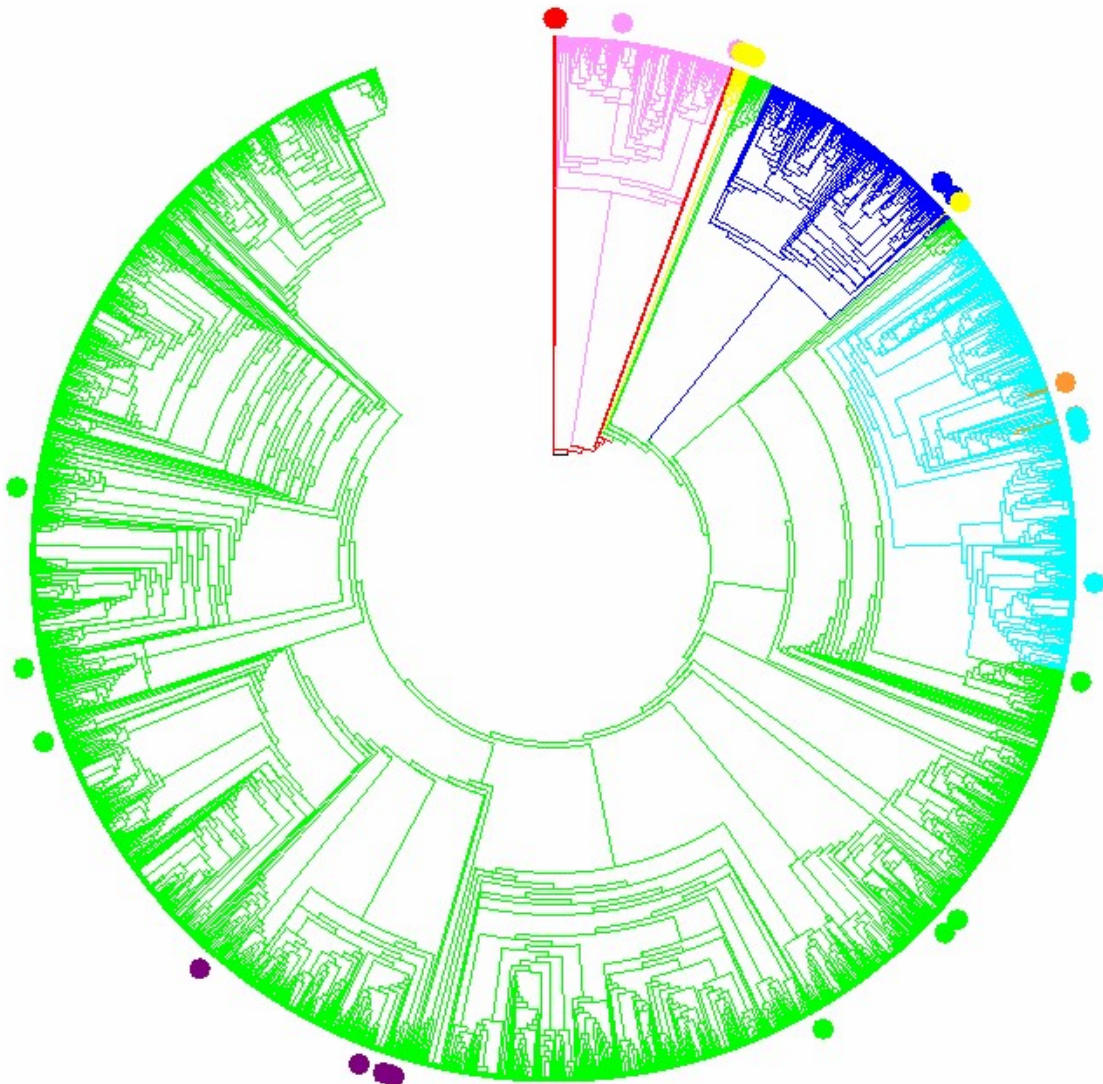
<https://doi.org/10.1042/BSR20171505>

Young, B., Zhao, X., Cook, A. R., Parry, C. M., Wilder-Smith, A., & I-Cheng, M. C. (2017). Do antibody responses to the influenza vaccine persist year-round in the elderly? A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*, 35(2), 212–221.

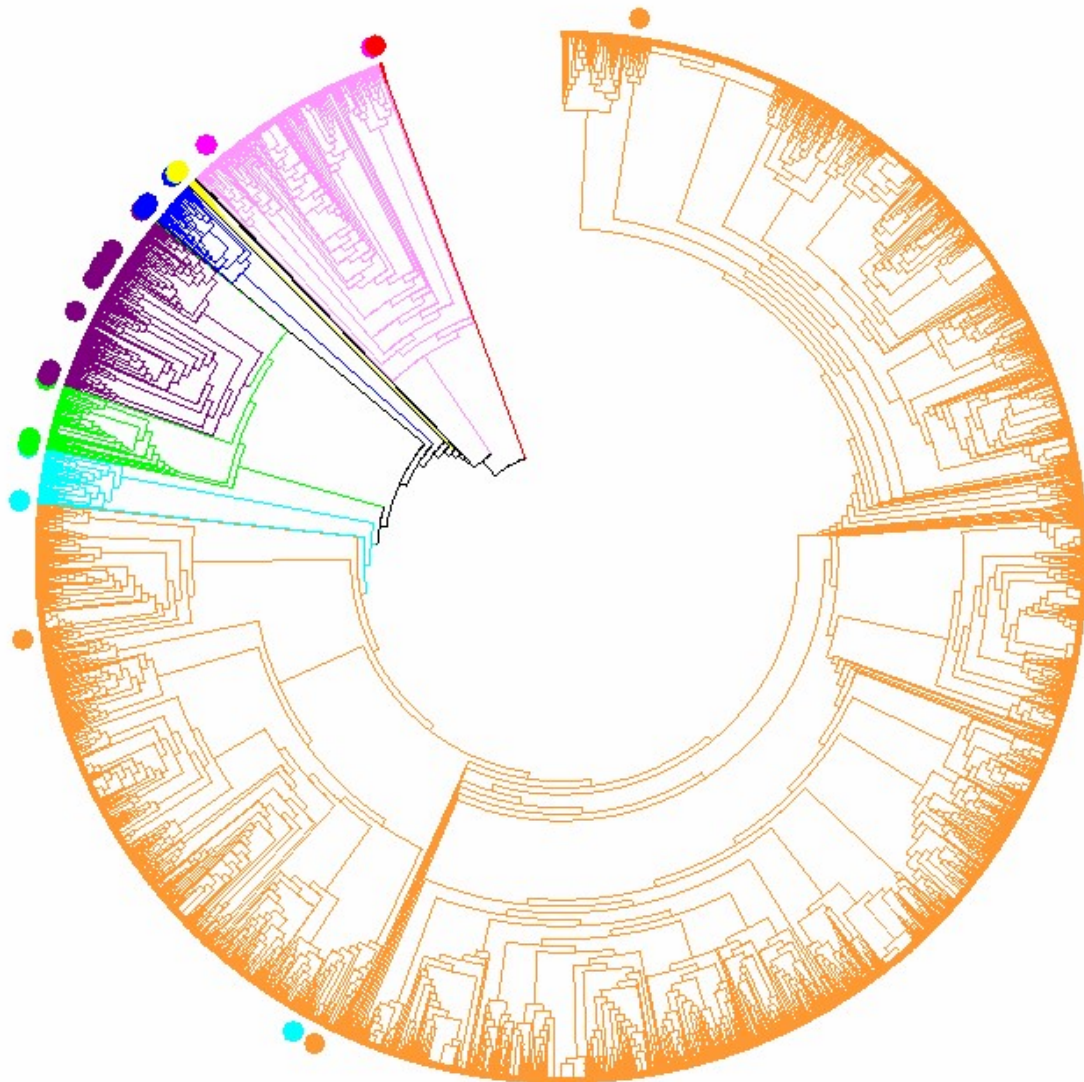
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.013>

Zhu, P., Liang, L., Shao, X., Luo, W., Jiang, S., Zhao, Q., Sun, N., Zhao, Y., Li, J., Wang, J., Zhou, Y., Zhang, J., Wang, G., Jiang, L., Chen, H., & Li, C. (2017). Host Cellular Protein TRAPPC6A $\Delta$  Interacts with Influenza A Virus M2 Protein and Regulates Viral Propagation by Modulating M2 Trafficking. *Journal of Virology*, 91(1), e01757-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01757-16>

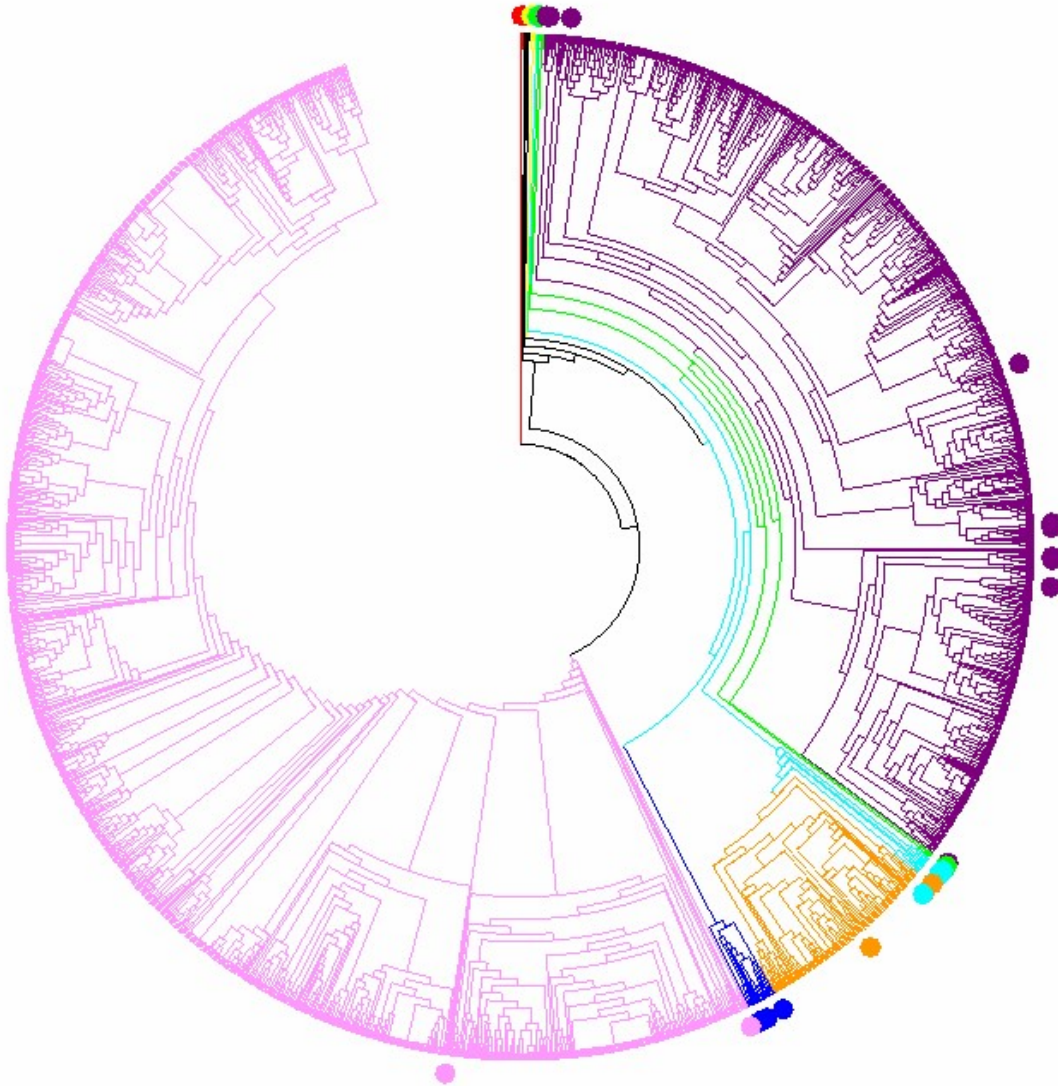
## 9.- Material suplementario



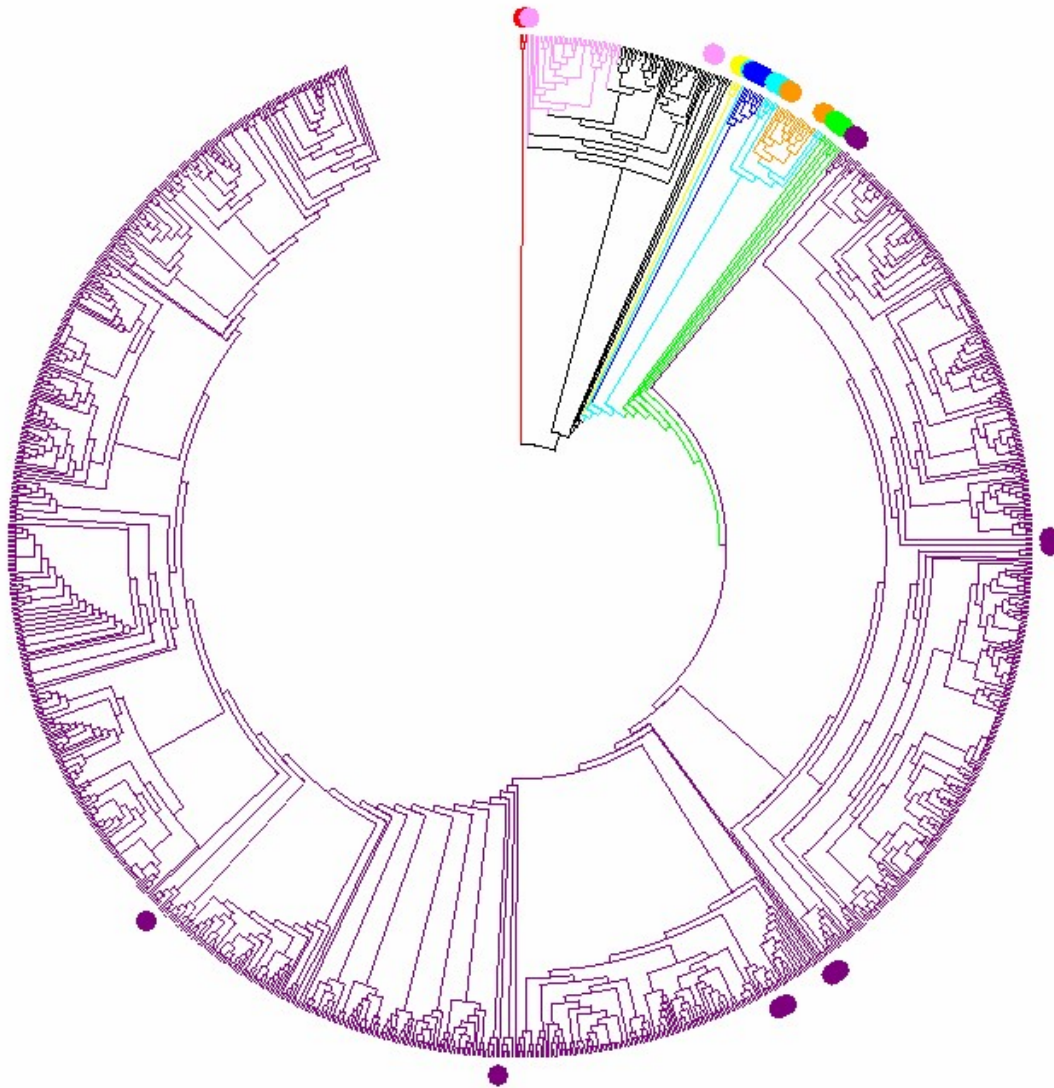
**Figura complementaria 1a** Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del Norte durante la temporada 2016-2017. El árbol filogenético está compuesto por 3125 secuencias de EE. UU., 1761 secuencias de Canadá, 32 secuencias de México y 63 secuencias de referencia. Todas las secuencias fueron descargadas de la plataforma GISAID. Esta temporada, se recomendó el virus A/Hong Kong/4801/2014 para la composición de la vacuna. La temporada 2016-2017 en Norteamérica se caracterizó por la circulación predominante de virus del clado 3C.2a1 (verde), y menos de la mitad de la circulación total correspondió a virus del clado 3C.2a2 (azul claro), clado 3C.3a (rosa), 3C.2a4 (amarillo) y 3C.2a3 (azul marino). Los círculos corresponden a los virus de referencia de los diferentes clados y subclados: 3C (rojo), 3C.2a1 (verde), 3C.2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja), 3C.2a3 (azul marino), 3C.2a4 (amarillo), 3C.3a (rosa) y 3C.2a1b (morado).



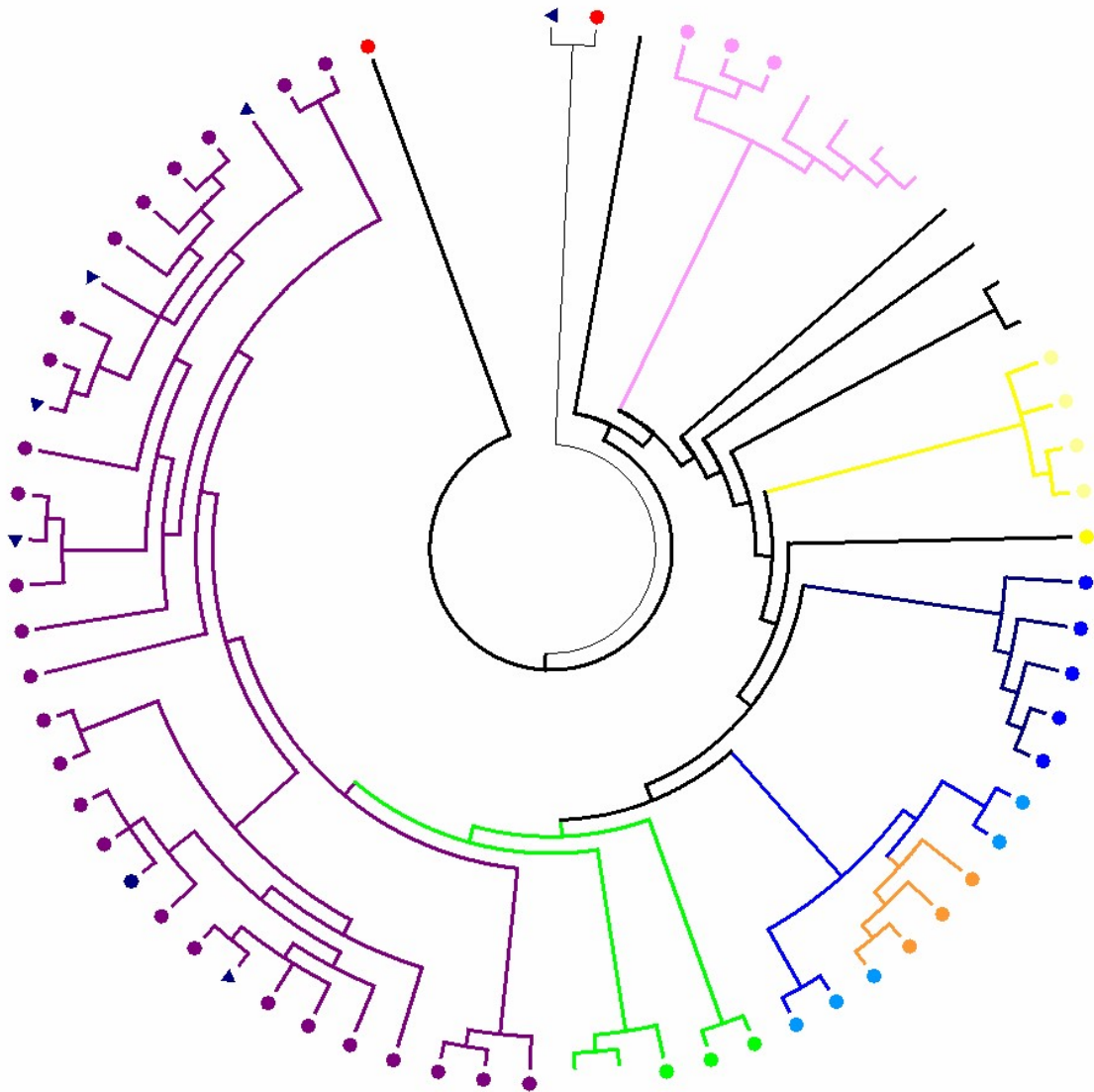
**Figura complementaria 1b** Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del Norte durante la temporada 2017-2018. El árbol filogenético se compone por 3885 secuencias de EE. UU., 2204 secuencias de Canadá, 42 secuencias de México y 63 secuencias de referencia. Todas las secuencias fueron descargadas de la plataforma GISAID. Esta temporada, se recomendó el virus A/Hong Kong/4801/2014 para la composición de la vacuna. La temporada 2017-2018 en América del Norte se caracterizó por una circulación casi nula de virus del clado 3C.2a2; sin embargo, predominaron los virus derivados de este clado, es decir, virus del clado 3C.2a2re (naranja), mientras que menos de la mitad de la circulación total correspondió a virus del clado 3C.3a (rosa), 3C.2a3 (azul marino) y el subclado 3C.2a1b derivado del clado 3C.2a1 (verde) que permaneció persistente en esta temporada. Los círculos corresponden a los virus de referencia de los diferentes clados y subclados: 3C (rojo), 3C.2a1 (verde), 3C.2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja), 3C.2a3 (azul marino), 3C.2a4 (amarillo), 3C.3a (rosa) y 3C.2a1b (morado).



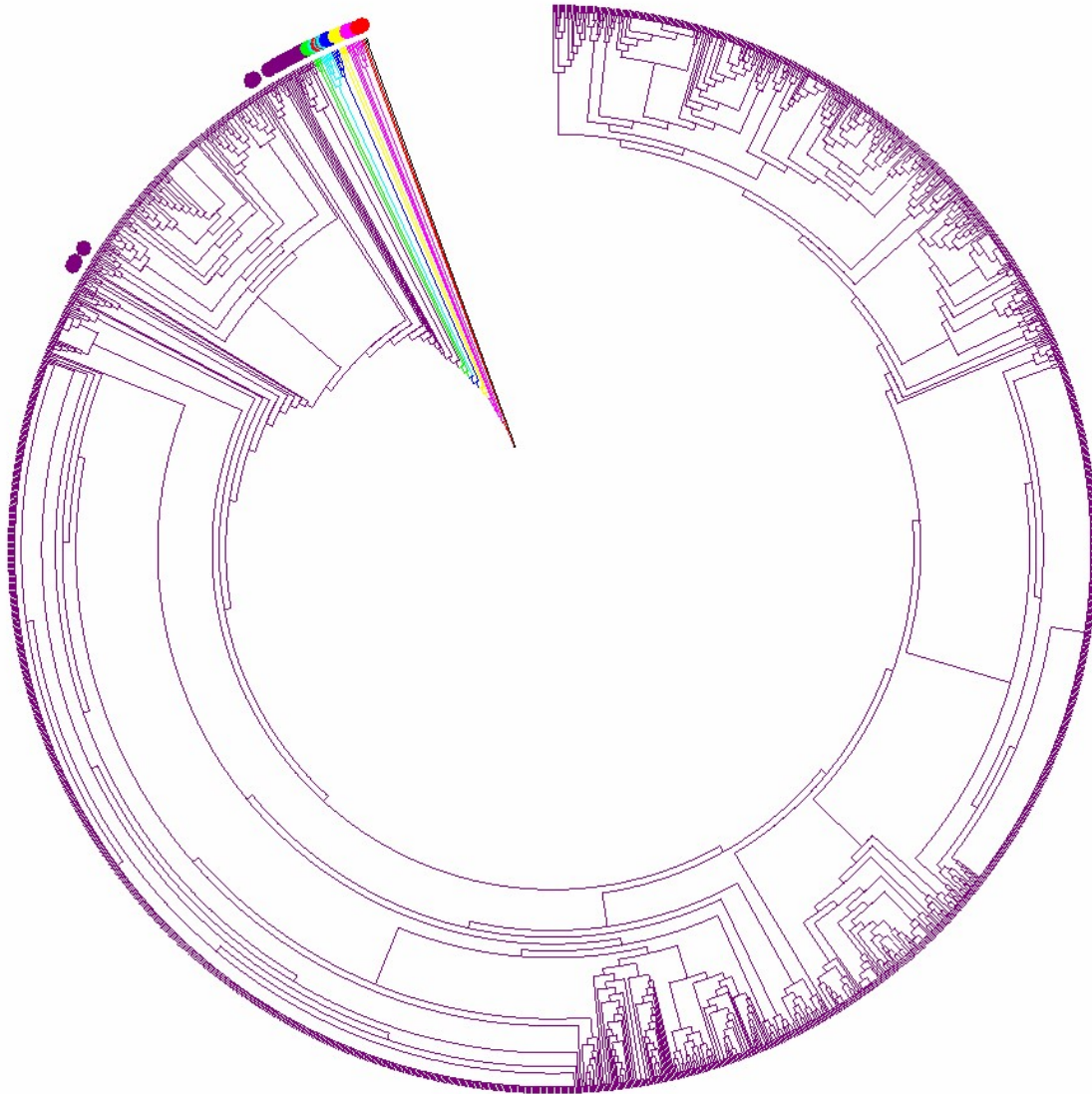
**Figura complementaria 1c** Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del Norte durante la temporada 2018-2019. El árbol filogenético está compuesto por 1092 secuencias de EE. UU., 873 secuencias de Canadá, 40 secuencias de México y 63 secuencias de referencia. Todas las secuencias fueron descargadas de la plataforma GISAID. Esta temporada, se recomendó el virus A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 para la composición de la vacuna. La temporada 2018-2019 en América del Norte se caracterizó por que la mitad de los virus circulantes pertenecían al clado 3C.3a (rosa), casi la otra mitad correspondía al subclado 3C.2a1b (púrpura), mientras que los clados 3C.2a2re (naranja), 3C .2a2 (azul claro), 3C.2a1 (verde) y 3C.2a3 (azul marino) continuaron persistiendo, pero en una proporción muy pequeña. Los círculos corresponden a los virus de referencia de los diferentes clados y subclados: 3C (rojo), 3C.2a1 (verde), 3C.2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja), 3C.2a3 (azul marino), 3C .2a4 (amarillo), 3C.3a (rosa) y 3C.2a1b (morado).



**Figura complementaria 1d** Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del Norte durante la temporada 2019-2020. El árbol filogenético estuvo compuesto por 624 secuencias de EE. UU., 430 secuencias de Canadá, 43 secuencias de México y 63 secuencias de referencia. Todas las secuencias fueron descargadas de la plataforma GISAID. Esta temporada, se recomendó el virus A/Kansas/14/2017 para la composición de la vacuna. La temporada 2019-2020 en América del Norte se caracterizó por el hecho de que continuaron circulando casi todos los virus circulantes pertenecientes al subclade 3C.2a1b (púrpura) y al clado 3C.3a (rosa), y los clados 3C.2a4 (amarillo) y 3C. 2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja) y 3C.2a1 (verde) prácticamente desaparecieron, con la presencia de estos últimos cuatro clados principalmente debido a los virus de referencia utilizados para construir el árbol filogenético. Los círculos corresponden a los virus de referencia de los diferentes clados y subclados: 3C (rojo), 3C.2a1 (verde), 3C.2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja), 3C.2a3 (azul marino), 3C .2a4 (amarillo), 3C.3a (rosa) y 3C.2a1b (morado).



**Figura complementaria 1e** Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del Norte durante la temporada 2020-2021. El árbol filogenético estuvo compuesto por 6 secuencias de USA, 0 secuencias de Canadá, 0 secuencias de México y 63 secuencias de referencia. Todas las secuencias fueron descargadas de la plataforma GISAID. Esta temporada, se recomendó el virus A/Hong Kong/267/2019 para la composición de la vacuna. La temporada 2020-2021 en América del Norte se caracterizó por la baja circulación de virus de influenza para la pandemia de COVID-19, solo circularon cinco secuencias para el subclade 3C.2a1b (triángulo azul) y el clado 3C.3 (triángulo azul). Los círculos corresponden a los virus de referencia de los diferentes clados y subclados: 3C (rojo), 3C.2a1 (verde), 3C.2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja), 3C.2a3 (azul marino), 3C.2a4 (amarillo), 3C.3a (rosa) y 3C.2a1b (morado).



**Figura complementaria 1f** Virus de la influenza A(H3N2) que circularon en América del Norte durante la temporada 2021-2022. El árbol filogenético estuvo compuesto por 1981 secuencias de EE. UU., 36 secuencias de Canadá, 0 secuencias de México y 63 secuencias de referencia. Todas las secuencias fueron descargadas de la plataforma GISAID. Esta temporada, se recomendó el virus A/Cambodia/e0826360/2020 para la composición de la vacuna. La temporada 2021-2022 en América del Norte se caracterizó por el hecho de que casi todos los virus circulantes pertenecen al subclade 3C.2a1b (púrpura). Los círculos corresponden a los virus de referencia de los diferentes clados y subclados: 3C (rojo), 3C.2a1 (verde), 3C.2a2 (azul claro), 3C.2a2re (naranja), 3C.2a3 (azul marino), 3C.2a4 (amarillo), 3C.3a (rosa) y 3C.2a1b (morado).

<b>Tabla suplementaria 1.- Números absolutos de casos y controles por tipo o subtipo de influenza</b>											
		<b>A(H1N1)</b>		<b>A(H3N2)</b>		<b>Influenza B</b>		<b>A/B coinfection</b>		<b>A no subtypeable</b>	
<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Todos (total)</b>	240										
Vacunados		1	70	26	70	6	70	1	70	0	70
No vacunados		7	80	37	80	14	80	1	80	1	80
<b>≤ 17 años (total)</b>	120										
Vacunados		0	19	5	19	3	19	0	19	0	19
No vacunados		5	51	25	51	13	51	1	51	0	51
<b>≥ 18 años (total)</b>	120										
Vacunados		1	51	21	51	3	51	1	51	0	51
No vacunados		2	29	12	29	1	29	0	29	1	29

A/B co-infección: Casos de influenza A(H3N2) en co-infección con influenza B



<b>Tabla suplementaria 2.- Estimados de la EV por tipo o subtipo de influenza</b>																
		<b>A(H1N1)</b>			<b>A(H3N2)</b>			<b>Influenza B</b>			<b>A/B coinfection</b>			<b>A no subtypeable</b>		
<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>VE (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Todos</b>	240	83.67	(0.01-1.35)	0.09	19.69	(0.44-1.45)	0.47	51.02	(0.17-1.34)	0.16	-14.29	(0.07-18.61)	0.92	61.94	(0.01-9.49)	0.55
<b>≤ 17 años (total)</b>	120	75.99	(0.01-4.54)	0.34	46.32	(0.17-1.60)	0.26	38.06	(0.15-2.41)	0.49	11.97	(0.03-22.54)	0.93	-	-	-
<b>≥ 18 años (total)</b>	120	71.57	(0.02-3.27)	0.31	0.49	(0.42-2.31)	0.99	-70.59	(0.16-17.16)	0.65	-71.84	(0.06-43.55)	0.74	80.91	(0.00-4.839)	0.31

EV: efectividad de la vacuna; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

<b>Tabla suplementaria 3.- Números absolutos de casos y controles por clados o subclados de influenza A(H3N2)</b>													
		3C.2a1		3C.2a1b		3C.2a2		3C.2a2re		3C.2a3		3C.3a	
Grupos	n	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
Todos (total)	240												
Vacunados		2	70	1	70	4	70	3	70	1	70	1	70
No vacunados		1	80	2	80	1	80	10	80	3	80	1	80
≤ 17 años (total)	120												
Vacunados		0	19	0	19	2	19	3	19	0	19	0	19
No vacunados		1	51	1	51	1	51	7	51	3	51	1	51
≥ 18 años (total)	120												
Vacunados		2	51	1	51	2	51	0	51	1	51	1	51
No vacunados		0	29	1	29	0	29	3	29	0	29	0	29

A/B co-infección: Casos de influenza A(H3N2) en co-infección con influenza B

<b>Tabla suplementaria 4.- Estimados de EV para clados o subclados de influenza A(H3N2)</b>																			
		<b>3C.2a1</b>			<b>3C.2a1b</b>			<b>3C.2a2</b>			<b>3C.2a2re</b>			<b>3C.2a3</b>			<b>3C.3a</b>		
<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>VE (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>EV (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Todos</b>	240	- 128.57	(0.20- 25.75)	0.50	42.86	80.05- 6.43)	0.65	- 357.14	(0.49- 41.86)	0.17	65.71	(0.09- 1.29)	0.11	61.9	(0.03- 3.74)	0.40	-14.29	(0.07- 18.61)	0.92
<b>≤ 17 años (total)</b>	120	11.97	(0.03- 22.54)	0.93	11.97	(0.03- 22.54)	0.93	- 436.84	(0.45- 62.68)	0.18	- 15.04	80.26- 4.91)	0.85	62.27	(0.01- 7.64)	0.52	11.97	(0.03- 22.54)	0.93
<b>≥ 18 años (total)</b>	120	- 186.41	(0.13- 61.69)	0.50	43.14	(0.03- 9.43)	0.69	- 186.41	(0.13- 61.69)	0.50	91.82	(0.00- 1.63)	0.10	- 170.84	(0.06- 43.55)	0.74	- 170.84	(0.06- 43.55)	0.74

EV: efectividad de la vacuna; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)

## A(H3N2) antigenic variation of influenza is associated with low vaccine efficacy in the early 2018 influenza season in Mexico City

Victor Alberto Hernández-Hernández<sup>a,b,#</sup>, Anjarath Lorena Higuera-Iglesias<sup>c</sup>, Gabriel Palma-Cortes<sup>a</sup>, Daniela Tapia-Trejo<sup>d</sup>, Santiago Ávila-Ríos<sup>d</sup>, Rubén Roberto González-Fernández<sup>a</sup>, Luis Ángel Pérez-Moreno<sup>a</sup>, Joaquín Alejandro Zuñiga-Ramos<sup>e,f</sup>, Cristóbal Guadarrama-Pérez<sup>g</sup>, José Luis Sandoval-Gutiérrez<sup>g</sup>, Carlos Cabello-Gutiérrez, Dr<sup>a,#,\*</sup>

<sup>a</sup> National Institute of Respiratory Diseases "Ismael Cosío Villegas" (INER), Department of Research in Virology and Mycology, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> National Autonomous University of Mexico, Postgraduate in Biological Sciences, Faculty of Medicine, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> National Institute of Respiratory Diseases "Ismael Cosío Villegas" (INER), Research in Clinical Epidemiology, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> National Institute of Respiratory Diseases "Ismael Cosío Villegas" (INER), Infectious Disease Research Center, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> National Institute of Respiratory Diseases "Ismael Cosío Villegas" (INER), Immunobiology and Genetics Laboratory, Mexico City, Mexico

<sup>f</sup> Tecnológico de Monterrey, School of Medicine and Health Sciences, Mexico City, Mexico

<sup>g</sup> National Institute of Respiratory Diseases "Ismael Cosío Villegas" (INER), Institutional Influenza Committee, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 March 2022

Revised 28 September 2022

Accepted 18 October 2022

## Keywords:

Influenza virus

Outpatients

Clades

Subclades

Phylogeny

Antigenic sites

## ABSTRACT

**Objectives:** We evaluated the VE and the mutations of the viruses present in the Mexican population at the beginning of 2018.

**Methods:** We diagnosed influenza in outpatients with a high-performance Rapid Influenza Diagnostic Test (RIDT) qRT-PCR. Descriptive statistics were used to describe the study population, while the chi-square test was used to determine clinical variables. VE was analyzed through a negative test design. We sequenced the hemagglutinin (HA) gene, performed a phylogenetic analysis, and analyzed the nonsynonymous substitutions both in and outside antigenic sites.

**Results:** Of the 240 patients analyzed, 42.5% received the trivalent vaccine, and 37.5% were positive for influenza. The VE for the general population for any influenza virus type or subtype was 37.0%, while the VE for the predominant influenza A(H3N2) subtype was the lowest (19.7%). The phylogenetic analysis of HA showed the co-circulation of clades and subclades 3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2, 3C.2a2re, 3C.2a3, and 3C.3a with identities approximately 97–98% similar to the vaccine composition.

**Conclusion:** Low VE was related to the co-circulation of multiple clades and subclades of influenza A(H3N2), with sufficient genetic and phenotypic distance to allow for the infection of vaccinated individuals.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## Introduction

With one billion cases and 389,000 fatalities annually, influenza is one of the world's greatest public health challenges (Paget *et al.*, 2019; World Health Organization, 2019).

\* Corresponding author: Carlos Cabello-Gutiérrez, Virology and Mycology Research Department, "Ismael Cosío Villegas" National Institute of Respiratory Diseases, Calzada de Tlalpan 4502, Section XVI, Tlalpan, Mexico City, 14080, Mexico.

E-mail address: [carloscginer@gmail.com](mailto:carloscginer@gmail.com) (C. Cabello-Gutiérrez).

# These authors contributed equally to the study.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.10.029>

1201-9712/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Vaccinating against influenza is one of the best prevention strategies; vaccinations have been associated with reductions in hospitalizations and severe cases of the disease, even when the viruses that infected patients did not match the composition of the influenza vaccine. However, the influenza vaccine effectiveness (VE) against the virus is generally low. (Centers for Disease Control and Prevention, 2019; Domínguez *et al.*, 2017; Mulpuru *et al.*, 2019; Rose *et al.*, 2020).

It has been hypothesized that the high rates of mutation of this type of virus may be associated with lower influenza VE

(Centers for Disease Control and Prevention, 2019; Jorquera et al., 2019).

During the 2017–2018 influenza season, the VE in North America ranged from 17–62%, depending on the influenza subtype or lineage analyzed. Subtype A(H3N2) was the predominant virus, with a VE of 17–22% and an unusual increase in hospitalizations and deaths. This season has been considered one of the most severe in recent decades (Potter et al., 2019; Rolfes et al., 2019; Skowronski et al., 2018).

The antigenic variation of influenza A(H3N2) viruses has not been analyzed in Mexico. In this work, we focus on the genetic characterization of influenza viruses and determine the VE in the Mexican population at the beginning of 2018 in Mexico City.

## Materials and methods

### Participants

All outpatients with influenza-like illness (ILI) presenting from January to April 2018 at the Ismael Cosío Villegas National Institute of Respiratory Diseases (*Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*) in Mexico City were invited to participate. Only those who gave their written consent to participate in the study were included (see ethics statement). ILI was defined based on the criterion of fever  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  and cough, with onset within the past 15 days (Castillejos et al., 2019). A respiratory sample was collected by nasopharyngeal swab, and each participant's clinical, demographic, and epidemiological history was collected.

### Diagnosis

Influenza diagnosis was carried out by first performing a rapid influenza diagnostic test (RIDT) using fresh respiratory samples obtained from the patient and then corroborating the result by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) (considered the gold standard), following Castillejos et al. (2019).

### Hemagglutinin sequencing

Due to reports of influenza virus prevalence during 2017–2018, we focused on amplifying only the hemagglutinin (HA) gene of the influenza A(H3N2) virus (1500 bp) using Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA). The following set of primers was used: HA-29F (5'-AAGCAGGGGATAATTCTATTAACC-3') with HA955R (5'-GGTTTGTCATTGGGAATGCT-3'), HA-298F (5'-CTCAGTGTGATGGCTTTCAA-3') and HA-1194R (5'-CTGCTTGAGTGCCTTTGAGATCTG-3'), and HA-936F (5'-AGCATTTCCAATGACAAACC-3') with HA-1716R (5'-GCATTAATGTTGCCCTTTGGCAGGC-3').

The reaction mixture and thermocycling conditions were prepared according to the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity kit instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). The products were then analyzed on 1.5% agarose gel and subsequently purified and concentrated to 9  $\mu\text{l}$  following the DNA Clean & Concentrator kit procedure (Zymo Research, Irvine, CA). Purified samples were mixed with the BigDye® Terminator v3.1 sequencing reaction following the manufacturer's instructions (ThermoFisher, Waltham, MA) using the same set of primers listed above. Sequences were obtained on an ABI Prism 3730 genetic analyzer (ThermoFisher) and assembled using BioEdit V7.0.5.3 and MEGA 7.0. The sequences can be found in GenBank (accession numbers MZ823415–MZ823444).

### Phylogenetic analysis

The genetic sequences of 63 influenza A(H3N2) virus strains of clades and subclades 3C, 3C.1, 3C.2, 3C.2a, 3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2,

3C.2a3, 3C.2a4, 3C.2b, 3C.3 and 3C.3a obtained from GISAID were used as references (Jorquera et al., 2019; Kissling et al., 2019a; Yang et al., 2018). The HA of the reference viruses and those sequenced in this study were aligned using Clustal W and MEGA 7.0. The phylogenetic analysis tree was inferred with a Maximum Likelihood method, based on the Hasegawa-Kishino-Yano model to estimate the evolutionary distance between the sequences analyzed and 1000 starting iterations for statistical support.

The aligned sequences were translated into amino acids with BioEdit V7.05.3, taking the virus A/Hong Kong/4801/2014 as a reference to determine the nonsynonymous changes inside and outside the antigenic sites. In addition, possible N-glycosylation sites were determined using the NetNGlyc 1.0 server, and the lysine signatures were located.

### Definition of vaccinated status and cases and controls

An outpatient was considered vaccinated if immunized with the trivalent influenza vaccine  $\geq 21$  days before the respiratory sample collection. The case group consisted of vaccinated and nonvaccinated outpatients with both a clinical ILI diagnosis and a positive qRT-PCR test result. The control group consisted of vaccinated and nonvaccinated outpatients with a clinical ILI diagnosis and a negative qRT-PCR test result.

### Statistical analysis

Descriptive statistics were first calculated to characterize the study population. A chi-square test was then calculated to compare the variables of age, sex, age groups, comorbidities, influenza vaccination, contacts, travel, and signs and symptoms between cases and controls. We determined the comorbidities, signs, and symptoms associated with a higher probability of influenza virus infection in cases and controls. We then determined the odds ratio (OR) values through bivariate unconditional logistic regression tests with a 95% CI.

The VE was determined using a negative test approach for all participants. We stratified by age group, influenza type, subtype, clades, and subclades using the equation  $(1 - \text{OR}) \times 100$ , inserting the aforementioned calculated OR values (Castillejos et al., 2019).

The association between case or control status and infection was analyzed through a multivariate model adjusted for potential confounding factors such as vaccination, age, sex, and the number of symptoms and comorbidities. We also performed a multivariate model for subtype A(H3N2) and other types and subtypes of influenza (adjusted for potential confounders such as vaccine type, age, gender, and the number of symptoms and comorbidities). All statistical analyses were calculated with version 20 of the SPSS statistical package and considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### Outpatient characteristics

Cases and controls were a median of 22.9 years and 23.6 years old, respectively (Table 1). The most frequent signs and symptoms were cough, rhinorrhea, and general malaise, with asthma, allergic rhinitis, and diabetes being the most frequent comorbidities. We compared cases and controls correcting by sex, age group ( $\leq 17$  years and  $\geq 18$  years), comorbidities, influenza vaccination, contact with influenza patients, and travel. We did not observe statistically significant differences. Among the signs and symptoms, we found significant differences in cough ( $P < 0.0001$ ), rhinorrhea ( $P = 0.04$ ), malaise ( $P < 0.0001$ ), fever ( $P = 0.01$ ), headaches ( $P = 0.04$ ), shivers ( $P < 0.0001$ ), myalgia ( $P < 0.0001$ ), arthralgia ( $P < 0.0001$ ), conjunctivitis ( $P < 0.0001$ ), chest pain ( $P < 0.0001$ ) and cyanosis ( $P = 0.02$ ).

**Table 1**  
Case-Control demographic and clinical characteristics.

Variable	Cases n = 90	Controls n = 150	P-value
Age, mean	22.9	23.6	NA
Female	45	83	0.8
<b>Age groups (years)</b>			
≤17	50	70	0.18
≥18	40	80	
<b>Comorbidities</b>			
Asthma	7	13	0.95
Allergic rhinitis	6	9	0.83
Diabetes	5	7	0.76
Hypertension	3	7	0.61
Smoking	2	4	0.83
Immunosuppression	0	3	0.33
Chronic obstructive pulmonary disease	1	1	0.71
<b>Influenza vaccination</b>			
Yes	32	70	0.09
Female	20	41	0.70
<b>Contacts and travels</b>			
Contact with an influenza patient	62	107	0.68
Recent travel	13	18	0.58
<b>Signs and symptoms</b>			
Cough	87	129	<b>0.00</b>
Rhinorrhoea	84	127	<b>0.04</b>
General malaise	82	117	<b>0.00</b>
Fever	81	115	<b>0.01</b>
Odynophagia	70	117	0.96
Headache	75	108	<b>0.04</b>
Shivers	74	93	<b>0.00</b>
Sudden symptom onset	64	97	0.30
Myalgia	77	79	<b>0.00</b>
Prostration	60	91	0.35
Arthralgia	72	73	<b>0.00</b>
Conjunctivitis	53	62	<b>0.00</b>
Dyspnea	43	65	0.50
Dysphonia	43	60	0.23
Chest pain	47	49	<b>0.00</b>
Abdominal pain	39	49	0.09
Diarrhea	19	19	0.08
Cyanosis	3	18	<b>0.02</b>
Disturbance of consciousness	4	5	0.66

Travels, considered those carried out in the last 15 days before presenting symptoms.

*Influenza vaccine effectiveness*

Cases and controls were compared by vaccination status (Table 2) and used to estimate VE. While analyses of VE yielded non-significant P-values, VE tended to be lower in the age group ≥ 18 years group (14.7%). Although VE was generally low for the entire study population (36.95%), a higher VE was observed within the ≤ 17-year-old group (48.87%).

We divided the influenza-positive cases by types and subtypes, and we found that the predominant viruses were from subtype A(H3N2), followed by influenza B and subtype A(H1N1). The least frequent viruses were those in co-infection (subtype A(H3N2) with influenza B), and there was only one ambulatory patient with a non-subtypeable influenza A virus (Supplementary Table 1).

The VE in this study was higher for subtype A(H1N1) for all ages and by age group compared to non-subtypeable influenza A, influenza B, subtype A(H3N2), and A/B co-infections. In contrast, co-infections A/B and subtype A(H3N2) resulted in the lowest VE. The VE in this study was higher for subtype A(H1N1) for all ages and by age group compared to non-subtypeable influenza A, influenza B, subtype A(H3N2), and A/B co-infections. In contrast,

**Table 2**  
VE in outpatients in early 2018.

Cases and controls by vaccination status Group	Cases	Controls	Estimated influenza VE		
			VE (%)	95% CI	P-value
<b>All (total)</b>					
Vaccinated	32	70	36.95	(0.36-1.07)	0.09
Unvaccinated	58	80			
<b>≤17 years (total)</b>					
Vaccinated	8	19	48.87	(0.20-1.28)	0.15
Unvaccinated	42	51			
<b>≥18 years (total)</b>					
Vaccinated	24	51	14.71	(0.39-1.86)	0.68
Unvaccinated	16	29			

VE, vaccine effectiveness.

**Table 3**  
Variables associated with influenza.

Variable	Adjusted odds ratio	95% CI	P-value
Vaccine	0.73	(0.39-1.35)	0.09
Age	1.00	(0.98-1.01)	0.80
Sex	1.49	(0.83-2.66)	0.42
Number of symptoms	0.79	(0.71-0.87)	<0.0001
Number of comorbidities	1.31	(0.78-2.19)	0.57

**Table 4**  
Influenza A(H3N2) associated with all types or subtypes of influenza.

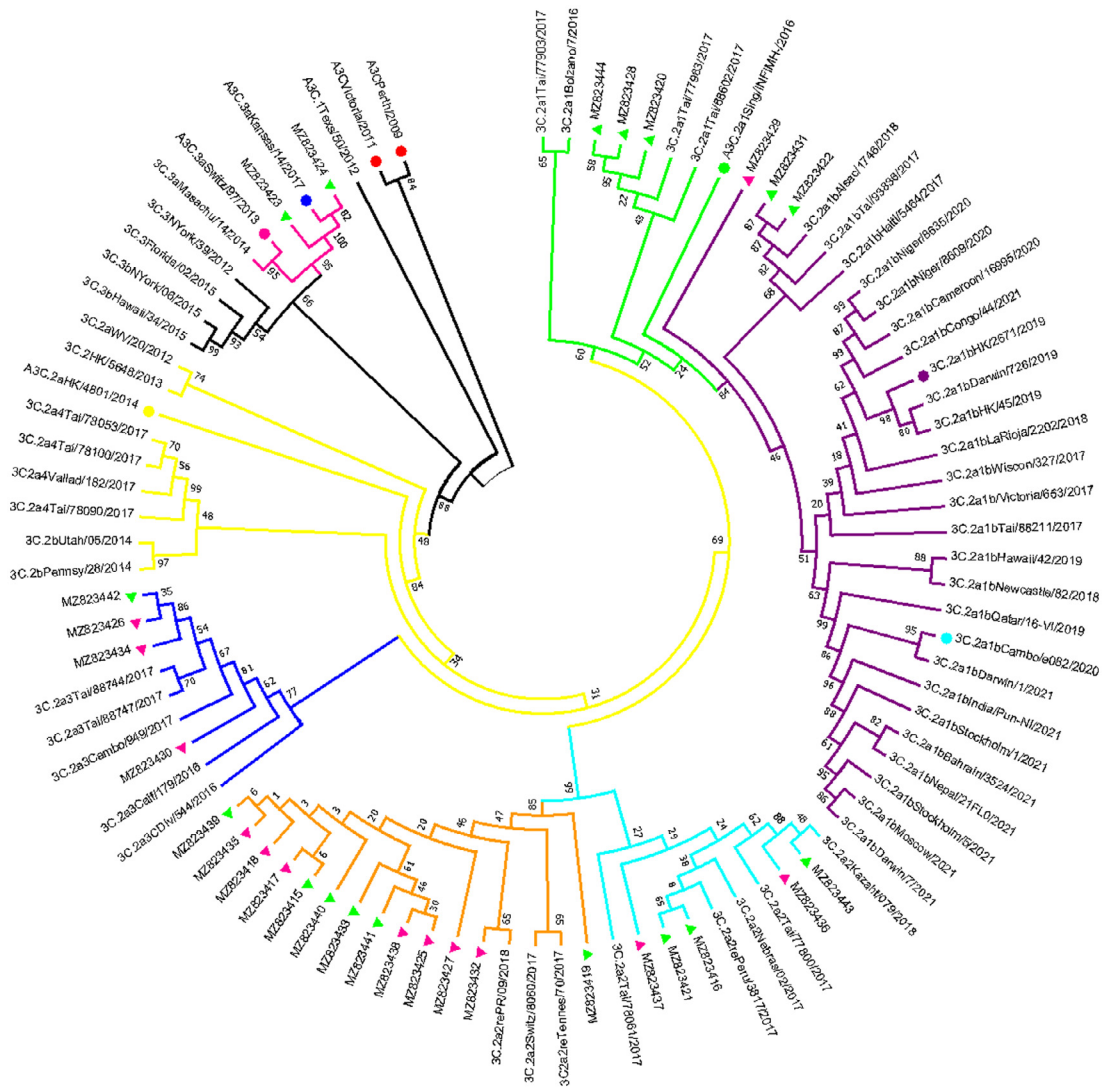
Variable	Adjusted odds ratio	95% CI	P-value
Vaccine	0.62	(0.19-1.98)	0.08
Age	1.01	(0.98-1.04)	0.08
Sex	2.33	(0.87-6.24)	0.03
Number of symptoms	0.93	(0.78-1.10)	0.65
Number of comorbidities	0.79	(0.36-1.74)	0.60

co-infections A/B and subtype A(H3N2) resulted in the lowest VE (Supplementary Table 2).

We then divided the influenza A(H3N2)-positive cases by clades and subclades, finding higher circulation of clade 3C.2a2re, followed by clades 3C.2a2 and 3C.2a3. Clade 3C.2a1 and the subclade 3C.2a1b circulated less, and clade 3C.3a had the absolute lowest circulation (Supplementary Table 3). Absolute numbers of cases and controls among the vaccinated and nonvaccinated, divided by influenza types, subtypes, clades, and subclades, were used to estimate the VE, yielding non-significant in all analyses (Supplementary Tables 2 and 4). However, our VE estimations tended to be higher for the subtype A(H1N1) across all ages and within age groups (≤17 years and ≥18 years) compared to the unsubtypeable influenza A, influenza B, the subtype A(H3N2), and A/B co-infections. Therefore, the VE tended to be lower for the subtype A(H3N2) and for A/B co-infections across all ages and within age groups compared to other influenza types and subtypes (except within the ≥ 18-year group for influenza B compared to A(H3N2), in which the opposite occurred (Supplementary Table 2).

While the multivariate analysis showed that the only factor associated with influenza was the number of symptoms (P<0.0001), the adjustment for comorbidities was not significant (Table 3). The multivariate analysis for influenza A(H3N2) against all types and subtypes of influenza, adjusted for sex, is the only analysis that reaches statistical significance (P= 0.03), while neither the vaccine age, number of symptoms, nor comorbidities reached statistical significance (Table 4).

In vaccinated individuals who developed symptoms, these presented typically 36 to 91 days after immunization. Patients with a positive RIDT test were treated with oseltamivir; none of the study participants required hospitalization.



**Figure 1.** Maximum probability tree based on Hasegawa-Kishino-Yano for the hemagglutinin of Mexican Influenza A(H3N2) viruses and reference viruses. Viruses include the clade 3C virus used for the vaccines of the 2010–2011, 2011–2012, and 2012–2013 seasons (red circles), clade 3C.1 virus used for the vaccine of the 2013–2014 and 2014–2015 seasons (brown circle), clade 3C.3a virus used for the vaccine of the 2015–2016 season (pink circle), clade 3C.2a virus used for the vaccines of the 2016–2017 and 2017–2018 seasons (yellow circle), clade 3C.2a1 virus used for the vaccine of the 2018–2019 season (green circle), clade 3C.3a virus used for the vaccine of the 2019–2020 season (purple circle) and subclade 3C.2a1b virus used for the 2021–2022 season vaccine (light blue circle). We highlight the branches of the viruses of clade 3C.3a (pink) and the branches of viruses of clade 3c.2a (yellow), from which clades 3C.2a3 (navy blue), 3C.2a2 (light blue), 3C.2a2c (orange) and 3C.2a1 (green) are derived; finally, subclade 3C.2a1 (purple) is derived from clade 3C.2a1. Samples from vaccinated Mexican outpatients (green triangles) and nonvaccinated patients (pink triangles) are highlighted and correspond to the sequences in GenBank with accession numbers **MZ823415–MZ823444**.

**HA gene analysis**

Of the 90 cases, 61 tested positive for influenza A(H3N2). Almost half of these (30) had sufficient nucleic acid for amplification and therefore had their HA gene amplified. The sequence identity of the study samples was deduced from the vaccine strain A/Hong Kong/4801/2014. The phylogenetic tree (Figure 1) shows two sequences of vaccinated patients located within clade 3C.3a, with identities ranging from 97.45–97.65% in similarity. The tree also shows three sequences of vaccinated patients in clade 3C.2a1 with 98.10–98.29% identity. Two other sequences of vaccinated patients and one of the unvaccinated patients are located in subclade 3C.2a1b with 98.25–98.29% identity. Seven sequences of unvaccinated and six vaccinated patients are located within clade 3C.2a2c with identities between 98.20–98.79%.

Clade 3C.2a2 had two sequences of unvaccinated patients and three sequences of vaccinated patients with 98.37–98.77% iden-

tity. One sequence of a vaccinated patient and three sequences of unvaccinated individuals are located in clade 3C.2a3 with 98.54–98.73% identity. No sequence from the Mexican virus was located in clades 3C, 3C.1, 3C.2, 3C.2a, 3C.2b, 3C.3, or 3C.2a4.

**Variations in amino acid residues of HA gene**

The nonsynonymous changes found in the 30 samples of vaccinated and unvaccinated outpatients were deduced from the A/Hong Kong/4801/2014 strain (Supplementary Table 5). Four changes were found in antigenic sites A and three in B for clade 3C.3a, while position 144 adds a lysine signature that also coincides with a glycosylation site. In clade 3C.2a1, three changes were found in antigenic sites A, two other changes in the B antigenic site, and three lysine signatures in positions 121, 135, and 171.

No changes were found within the A antigenic site in the subclade 3C.2a1b, only one change was found at the adjacent posi-



tion 121, and three modifications were found at the B antigenic site with the addition of two lysine features at positions 121 and 171. Most of this study's 3C.2a2re clade shared two changes in antigenic site A, two in B, and one in E. We also observed a change in position S199P in four samples from women. In clade 3C.2a2, we observed two changes in antigenic site A, two in B, and one in E. Positions 131 and 142 added two lysine signatures, as well as site 131 with a potential loss of glycosylation. We also observed the S198P change only in two samples. In clade 3C.2a3, we found the N121K change adjacent to the A antigenic site. Within this site, two changes in positions 121, 135, 144, and 150 add four lysine signatures and two sites with a potential loss of glycosylation at positions 135 and 144.

## Discussion

The efficacy of the vaccine administered at the start of 2018 in Mexico City decreased because of the effect of the co-circulating antigenic variation of the A(H3N2) viruses. This retrospective study demonstrates a lower influenza vaccine efficiency associated with the circulation of the viruses with important antigenic differences, not covered by the contemporary vaccine in Mexico City, during the 2017–2018 influenza season.

A case-control study design was selected as the optimal method of estimating the VE for influenza in this population. The case and control groups were similar to each other in demographic and clinical variables, with the only exception being the number of signs and symptoms. We found the highest proportion of signs and symptoms in the case group, suggesting that influenza causes a greater number of signs and symptoms compared to a control group. The multivariate analysis confirmed that the signs and symptoms described were associated with influenza infection, providing useful information for clinical diagnosis. However, as signs and symptoms are also related to COVID-19, other methods (such as high-sensitivity RIDT) should therefore be used to rule out COVID-19 or other respiratory viral infections to provide timely care during influenza outbreaks (Castillejos et al., 2019).

Upon analyzing comorbidities, no correlation was seen between comorbidities and influenza or the A(H3N2) subtype. However, this could very well be because of the small number of individuals with comorbidities in our study. The other demographic characteristics analyzed did not show associations with influenza. In particular, we expected the vaccination variables to have a significant negative association with influenza or to act as a protective factor against infection. However, in all the analyses carried out with the vaccine variables, we did not find any significant positive or negative associations with influenza.

Other authors observed a decrease in VE in the range of 10% and 15% between the 2016–2017 to 2017–2018 influenza seasons, respectively, in the US and Europe. In the same influenza seasons in Canada, authors reported a decrease in VE of 22% only analyzing the subtype A(H3N2) (Flannery et al., 2017; Kissling et al., 2019b; Rolfes et al., 2019; Skowronski et al., 2020). During those same influenza seasons, our data show a 3.75% increase in overall VE, but if we look only at VE for the A(H3N2) subtype, we see a 23.91% decrease in VE (Castillejos et al., 2019). These data coincide with the adjustments proposed by the WHO and the changes observed in the A(H3N2) component of the vaccine for the following influenza season, reinforcing the importance of the year-by-year monitoring of influenza viruses.

Studies that analyze the antigenic distance among influenza viruses provide a way to study some of the protective mechanisms of vaccines and their relationship with virus evolution. All clades and subclades (3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2re, 3C.2a2, and 3C.2a3) of this study showed their phylogenetics distance with regard to the clade 3C.2a from which they derived. This clade was also the com-

ponent of the vaccine strain applied to our study population. Antigenic distances were studied in relation to their phylogenetic distances by Jorquera et al. (2019), using sera with antibodies coming from previous immunizations and raising these sera against reference viruses for each clade and subclade previously mentioned. Taking this study as reference, the viruses from clade 3C.3a of this study showed a larger antigenic distance from the viruses derived from clade 3C.2a; therefore, they also showed a larger antigenic distance from the vaccine strain virus. The greater the antigenic distance between clades and/or subclades of influenza A(H3N2), the greater the probability of infection (Jorquera et al., 2019).

Unprecedented public health measures were implemented at the start of the COVID-19 pandemic; these measures led to a dramatic decrease in the detection of influenza. It is even thought that viruses of the B/Yamagata lineages went extinct halfway through 2020 (Dhanasekaran et al., 2022; Gouma et al., 2020). The same seems to have happened with the subclades derived from the clade 3C.2a (except for 3C.2a1b) reported before the COVID-19 pandemic. However, it is not clear whether these apparently extinct clades and subclades of A(H3N2) and influenza B lineage will reappear and predominate in future influenza seasons, with severe consequences. For these reasons, it is difficult to make recommendations about the components of the influenza A(H3N2) vaccine in the future. Ideally, these vaccines should have both 3C.3a and 3C.2a1b antigens, but this implies going from trivalent and quadrivalent to pentavalent vaccines, which could not be immediately feasible (Dhanasekaran et al., 2022; Gouma et al., 2020).

We propose switching to the fabrication of chicken embryo-based pentavalent vaccines, and/or the use of RNA vaccines to increase VE in the future. We also propose to continue encouraging vaccination, given the increase in influenza vaccination acceptance and intent after COVID-19. We also consider it important to continue promoting hand washing, mask use, and social distancing measures whenever local outbreaks are identified because these measures have been demonstrated to be effective in influenza prevention and complementary to vaccination (Bloom et al., 2021; Fernández-Rojas et al., 2021; Kong et al., 2022).

## Funding

The research funds of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” supported the realization of this project.

## Ethics statement

The INER Science and Bioethics Committee reviewed and approved this study (INER/CEI/429/18 and INER/CEI/458/18). All data collected from patients are protected by current regulations for the protection of personal data in Mexico, in addition to the fact that all participants or legal guardians gave their consent to participate in the study. The samples were protected and processed according to the current law established in NOM-012-SSA3-2012.

## Author contributions

VAHH and CCG conceived the idea and participated in the design and coordination of the study. VAHH, ALHI, and GPC collected patient samples and epidemiological data and monitored the natural history of the disease in patients. VAHH, DTT, and SAR performed the experimental procedures. VAHH and ALHI analyzed the data. VAHH and CCG prepared the first draft of the paper. All authors read and approved the final version of the paper.

## Declaration of competing interest

The authors have no competing interests to declare.

## Acknowledgments

VAHH thanks the “Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas” of the Universidad Nacional Autónoma de México, and the scholarship received from the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT-México)”, with the CVU/Scholar: 587984/307257. We acknowledge the authors who originated and submitted the influenza sequences to the GISAID database on which the supplementary figures were based.

## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.ijid.2022.10.029](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.10.029).

## References

- Bloom K, van den Berg F, Arbutnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther* 2021;28:117–29.
- Castillejos M, Cabello-Gutiérrez C, Alberto Choreño-Parra JA, Hernández V, Romo J, Hernández-Sánchez F, et al. High performance of rapid influenza diagnostic test and variable effectiveness of influenza vaccines in Mexico. *Int J Infect Dis* 2019;89:87–95.
- Centers for Disease Control and Prevention. How the flu virus can change: “drift” and “shift.”; 2019 <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm> accessed 19 September 2021.
- Dhanasekaran V, Sullivan S, Edwards KM, et al. Human seasonal influenza under COVID-19 and the potential consequences of influenza lineage elimination. *Nat Commun* 2022;13:1721.
- Domínguez A, Soldevila N, Toledo D, Godoy P, Espejo E, et al. The effectiveness of influenza vaccination in preventing hospitalisations of elderly individuals in two influenza seasons : a multicentre case-control study, Spain, 2013/14 and 2014/15. *Euro Surveill* 2017;22:30602.
- Fernández-Rojas MA, Luna-Ruiz Esparza MA, Campos-Romero A, et al. Epidemiology of COVID-19 in Mexico: symptomatic profiles and presymptomatic people. *Int J Infect Dis* 2021;104:572–9.
- Flannery B, Chung JR, Thaker SN, Monto AS, Martin ET, et al. Interim estimates of 2016–17 seasonal influenza vaccine effectiveness - United States, February 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017;66:167–71.
- Gouma S, Weirick M, Hensley SE. Antigenic assessment of the H3N2 component of the 2019–2020 Northern Hemisphere influenza vaccine. *Nat Commun* 2020;11:2445.
- Jorquera PA, Mishin VP, Chesnokov A, Nguyen HT, Mann B. Insights into the antigenic advancement of influenza A(H3N2) viruses, 2011–2018. *Sci Rep* 2019;9:2676.
- Kissling E, Pozo F, Buda S, Gherasim AM, Brytting M, et al. Low 2018/19 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) among 15–64-year-olds in Europe: exploration by birth cohort. *Euro Surveill* 2019;24.
- Kissling E, Pozo F, Buda S, Vilcu A, et al. Effectiveness of influenza vaccine against influenza A in Europe in seasons of different A(H1N1)pdm09 and the same A(H3N2) vaccine components (2016–17 and 2017–18). *Vaccine X* 2019;3.
- Kong G, Lim NA, Chin YH, Ng YPM, Amin Z. Effect of COVID-19 pandemic on influenza vaccination intention: a meta-analysis and systematic review. *Vaccines* 2022;10:606.
- Mulpuru S, Li L, Ye L, Hatchette T, Andrew MK, et al. Effectiveness of Influenza Vaccination on Hospitalizations and Risk Factors for Severe Outcomes in Hospitalized Patients With COPD. *Chest* 2019;155:69–78.
- Paget J, Spreeuwenberg P, Charu V, Taylor RJ, Iuliano AD, et al. Global mortality associated with seasonal influenza epidemics : new burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *J Glob Health* 2019;9 020421.
- Potter BI, Kondor R, Hadfield J, Huddleston J, Barnes J, et al. Evolution and rapid spread of a reassortant A(H3N2) virus that predominated the 2017–2018 influenza season. *Virus Evol* 2019;5 vez046.
- Rolfes MA, Flannery B, Chung JR, O'Halloran A, Garg S, et al. Effects of influenza vaccination in the United States during the 2017–2018 influenza season. *Clin Infect Dis* 2019;69:1845–53.
- Rose AMC, Kissling E, Gherasim A, Casado I, Bella A, et al. Vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) and B among laboratory-confirmed, hospitalised older adults, Europe, 2017–18: a season of B lineage mismatched to the trivalent vaccine. *Influenza Other Respi Viruses* 2020;14:302–10.
- Skowronski DM, Chambers C, De Serres G, Dickinson JA, Winter AL, et al. Early season co-circulation of influenza A(H3N2) and b(yamagata): interim estimates of 2017/18 vaccine effectiveness, Canada, January 2018. *Euro Surveill* 2018;23:18–00035.
- Skowronski DM, Leir S, Sabaiduc S, Chambers C, Zou M, et al. Influenza vaccine effectiveness by A(H3N2) phylogenetic sub-cluster and prior vaccination history: 2016–2017 and 2017–2018 epidemics in Canada. *J Infect Dis* 2020;225:1387–98.
- World Health Organization. Global influenza strategy 2019–2030; 2019 Disponible [https://www.who.int/influenza/Global\\_Influenza\\_Strategy\\_2019\\_2030\\_Summary\\_English.pdf?ua=1](https://www.who.int/influenza/Global_Influenza_Strategy_2019_2030_Summary_English.pdf?ua=1) accessed 19 September 2021.
- Yang JR, Hsu SZ, Kuo CY, Huang HY, Huang TY, et al. An epidemic surge of influenza A(H3N2) virus at the end of the 2016–2017 season in Taiwan with an increased viral genetic heterogeneity. *J Clin Virol* 2018;99–100:15–21.