



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**DETECCIÓN Y COMPORTAMIENTO DE VIRUS B/VICTORIA
CON DOBLE DELECIÓN DE AMINOÁCIDOS EN EL GEN DE
LA HEMAGLUTININA, EN MUESTRAS RECIBIDAS POR EL
INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
EPIDEMIOLÓGICA EN 2017-2019**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A :

FERNANDO VALLEJO SANTIN

JURADO DE EXAMEN

DIRECTORA: M. EN C. GISELA BARRERA BADILLO

ASESOR: DR. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA

ASESORA: DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

SINODAL: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

SINODAL: M. EN C. VÍCTOR ALAN ALCÁNTARA MEJÍA



CIUDAD DE MÉXICO

MAYO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos institucionales

A la UNAM que ha sido mi casa de estudios durante estos años.

Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica Dr. Manuel Martínez Báez, particularmente al laboratorio de virus respiratorios.

A la M. en C. Gisela Barrera Badillo, directora de este trabajo, jefa del laboratorio de virus respiratorios.

A la división de influenza del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Agradecimientos

Maestra Gisela, de verdad le agradezco mucho su confianza a pesar de las veces en que me equivoqué y tomarse el tiempo aun en medio de la pandemia para ayudarme con las revisiones, lo aprecio mucho.

Dr. Aníbal, mi asesor interno, por toda su paciencia, buenos consejos y sugerencias, gracias, y en particular por inculcarme un buen modelo de aprendizaje y señalar y corregir mis malas prácticas de laboratorio.

Dra. Lucy, aprecio mucho la calidez y sinceridad con que siempre me ha tratado, le agradezco mucho por aceptar ser mi asesora sin dudarlo y por todo el conocimiento que me compartió.

Dr. Mercado, gracias porque aun con sus múltiples ocupaciones y responsabilidades accedió a ser mi sinodal.

Maestro Víctor, en serio valoro mucho el gesto de que aceptaras ser sinodal de este trabajo y el interés que has tenido porque este proceso avance.

Al Dr. José Luis Flores por ayudarme a prepararme para la presentación y por todo su apoyo.

A toda la gente en el InDRE, dentro y fuera del LVIR por su confianza, por tenderme la mano, y por su gran paciencia para conmigo.

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica Dr. Manuel Martínez Báez, en el Laboratorio de Virus Respiratorios (LVIR) bajo la dirección de la M. en C. Gisela Barrera Badillo.

Dedicatoria

Primeramente, quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi Dios, porque sin Él nada de esto sería posible, por permitirme terminar la hermosa carrera de biología, que estoy seguro que ama.

Tuya es, oh Jehová, la magnificencia y el poder, la gloria, la victoria y el honor; porque todas las cosas que están en los cielos y en la tierra son tuyas. Tuyo, oh Jehová, es el reino, y tú eres excelso sobre todos.

1 Crónicas 29:11

A mi familia, mis padres, Fernando y Alejandra, porque nunca me dejaron solo, siempre han estado para mí y han dado todo de si, trabajando cuanto han podido y motivándome en cada paso. Mis hermanos, Isaac y Sarai por todo su apoyo, por escucharme, por acompañarme.

A mi maestra de biología en la prepa, la profa Diana, por motivarme a estudiar esta hermosa carrera.

A mis amigos durante la carrera, las “tragonias” no sé qué habría sido sin ellos: Carlos, Lu, Sebas, Lalo, Luis, Jannet, Lezama, Estefany; por su amistad incondicional, han sido muy buenos tiempos.

A mi colega y amiga Alejandra, un ejemplo a seguir de superación y dedicación.... las risas no faltaron eh.

A mis amigos fuera de la universidad, por animarme e impulsarme cuando hacía falta.

También a todos y cada uno de los miembros del laboratorio de Toxicología Genética en la UMIEZ, docentes y compañeros a quienes llevo conmigo.

Este es un sueño que he tenido... desde el almuerzo... y no pienso renunciar a el ahora.

- Michael Scott

Índice

I. Introducción	1
1.1 Influenza	1
1.2 Clasificación	1
1.3 Hospederos	2
1.4 Estructura	4
1.5 Replicación del virus.....	6
1.6 Hemaglutinina	12
1.7 Evolución	15
1.8 Linajes.....	17
1.9 Epidemiología	17
1.10 Sintomatología	20
1.11 Respuesta Inmune.....	21
1.12 Tratamiento.....	22
1.13 Prevención.....	25
1.14 Vigilancia epidemiológica.....	26
II. Antecedentes	28
2.1 Nueva variante con Doble deleción	28
2.2 Circulación global	30
III. Justificación	31
IV. Hipótesis.....	31
V. Objetivos	31
5.1 General	31
5.2 Específicos	32
VI. Materiales y métodos	32
6.1 Obtención de muestras	32
6.2 Búsqueda de los casos.....	33
6.3 Extracción de ARN viral	33
6.4 Reacción en cadena de la polimerasa	34
6.5 Análisis de resultados.....	39
VII. Resultados.....	41
7.1 Número de muestras.....	41

7.2 Distribución por sexo	43
7.3 Distribución geográfica	44
7.4 Distribución por edad.....	47
7.5 Días de evolución	49
7.6 Sintomatología	50
7.7 Estacionalidad	56
7.8 Clasificación del paciente	57
7.9 Vacunación	59
VIII. Discusión	60
8.1 Número de muestras y distribución geográfica	60
8.2 Grupos etarios	61
8.3 Evolución de los casos	63
8.4 Sintomatología	63
8.5 Estacionalidad	65
8.6 Tipo de paciente.....	66
8.7 Vacunación	67
IX. Conclusión	68
X. Referencias.....	69

I. Introducción

1.1 Influenza

Es una enfermedad infecciosa respiratoria, aguda y contagiosa de origen viral que afecta el tracto respiratorio superior, aunque fácilmente alcanza bronquios y alvéolos. Se propaga de persona a persona por medio de aerosoles (García-García y Ramos, 2006; Franco-Paredes *et al.*, 2006).

En cualquiera de sus variantes, ya sea pandémica, zoonótica o epidémica estacional supone una grave amenaza a la salud pública en todo el mundo (OMS, 2009).

1.2 Clasificación

Los agentes etiológicos de esta enfermedad son virus pertenecientes a la familia Orthomyxoviridae (Figura 1), nombre dado por la palabra *orthos*: derecho y *mixo*: mucus, debido a su afinidad por las mucinas (Mateos, 2008).

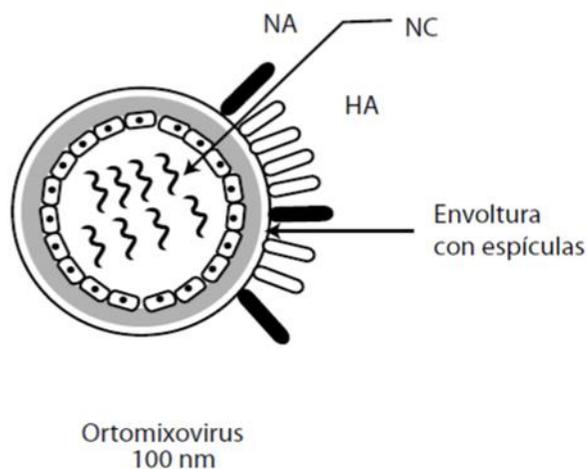


Figura 1. Virión característico de la familia orthomyxoviridae; NA: Neuraminidasa; NC: Nucleocápside; HA: Hemaglutinina (Tomado y modificado de Mateos, 2016).

Dentro de esta familia se reconocen cuatro géneros causantes de influenza: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus* y *Deltainfluenzavirus* (Virus de la influenza A, B, C y D respectivamente) (Hutchinson, 2018). El último fue aislado en 2011 y aunque en un principio se le consideró dentro del género del virus causante de la influenza tipo C ahora constituye uno nuevo (Su *et al.*, 2017). Se distinguen por las características antigénicas de las proteínas que componen sus viriones, particularmente las proteínas de matriz (M), específica para cada uno (Hause *et al.*, 2014), además del hecho de que los virus de influenza tipo C a diferencia de los primeros dos cuentan con un genoma de solo siete segmentos y no ocho (de Velthuis y Fodor, 2016), estas porciones se describirán más adelante.

Otros dos grupos dentro de esta familia son los *Thogotovirus* e *Isavirus* que infectan a insectos y peces, respectivamente (Ortín, 2004).

El género de los virus de la influenza A se divide en 18 subtipos antigénicos como resultado de la variedad de sus proteínas de membrana mientras que el género B está limitado a un único subtipo con dos linajes antigénicos distintos: B/Victoria y B/Yamagata (Fulton *et al.*, 2018).

1.3 Hospederos

Las aves son un reservorio natural para toda la variedad genética de los virus del género *Alphainfluenzavirus*, especialmente las silvestres acuáticas, migratorias, pertenecientes a los órdenes Anseriforme, Passeriforme y Charadriiforme (Figura 2), en los cuales han alcanzado un estado evolutivo estable replicándose en las células superficiales del tracto intestinal sin causarles trastornos de salud y excretándose a través de las heces en los cuerpos de agua a altas concentraciones ($10^{8.7}$ D₅₀, dosis infectantes de embrión de pollo) infectando así a mamíferos de granja y marinos (García-García y Ramos, 2006; Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 2009). El tipo C de los virus influenza restringe su circulación a la población humana,

casi exclusivamente en niños, aunque existe evidencia de su presencia en cerdos (Franco-Paredes *et al.*, 2006; te Velthuis y Fodor, 2016).

Por otra parte, los virus de la influenza B circulan limitados al ser humano, aunque en 1995 se documentó un salto de especie, de humanos a focas. Han conseguido replicarse en cerdos, no limitándose a solo infectarlos sino también causando enfermedad, seroconversión y lesiones pulmonares; otros estudios han mostrado su presencia en perros, rumiantes y chimpancés, lo cual sugiere que los mamíferos son más susceptibles a este género. La explicación aceptada es que el hospedero juega un rol de vital importancia que va más allá de poseer los receptores virales apropiados pues la síntesis de ARNm viral precisa de elementos de las células hospederas, la polimerasa II e importinas alfa así como proteínas ANP32 cuyas concentraciones varían entre especies, Figura 3 (Koutsakos *et al.*, 2016; te Velhuis y Fodor, 2016; Zhag *et al.*, 2020).

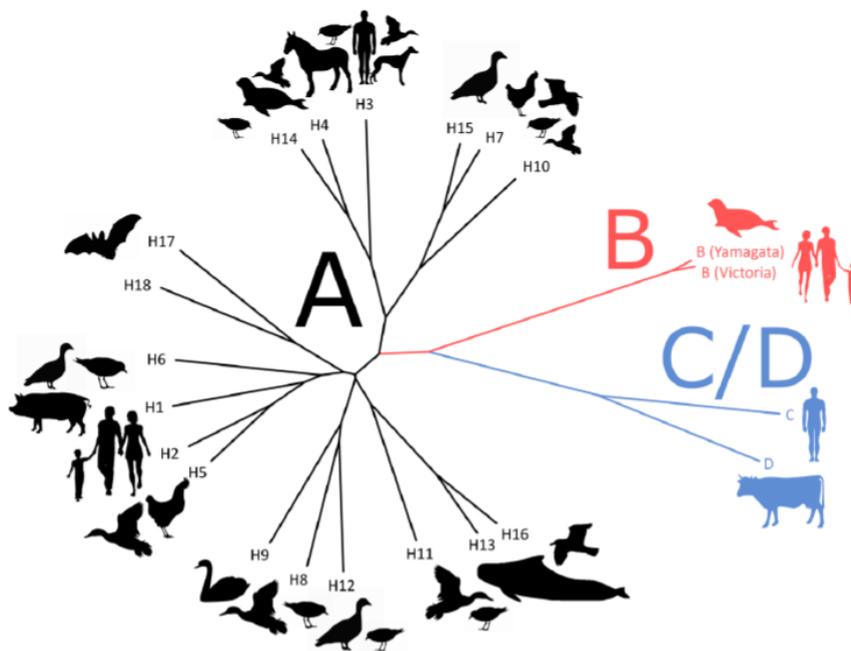


Figura 2. Taxonomía y ecología de los virus de Influenza. Hospederos naturales para los cuatro géneros de la familia Orthomixoviridae. En los virus de influenza A se indican los subtipos de hemaglutinina que predominan en cada reservorio (Tomado Hutchinson *et al.*, 2018).

1.4 Estructura

Los viriones son envueltos y filamentosos o pleomorfos con apariencia esférica, su diámetro va de 80 a 120 nm (Figura 3); poseen nucleocápsides de simetría helicoidal englobando un genoma multipartito de 7 u 8 segmentos constituidos por cadenas sencillas de ARN con sentido negativo (Couch, 1996; Hutchinson, 2018), cada uno adosado a proteínas con actividad catalítica (Prats, 2013); dos de ellos codifican para dos glucoproteínas de membrana elementales en forma de espículas, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (Hun, 2009).

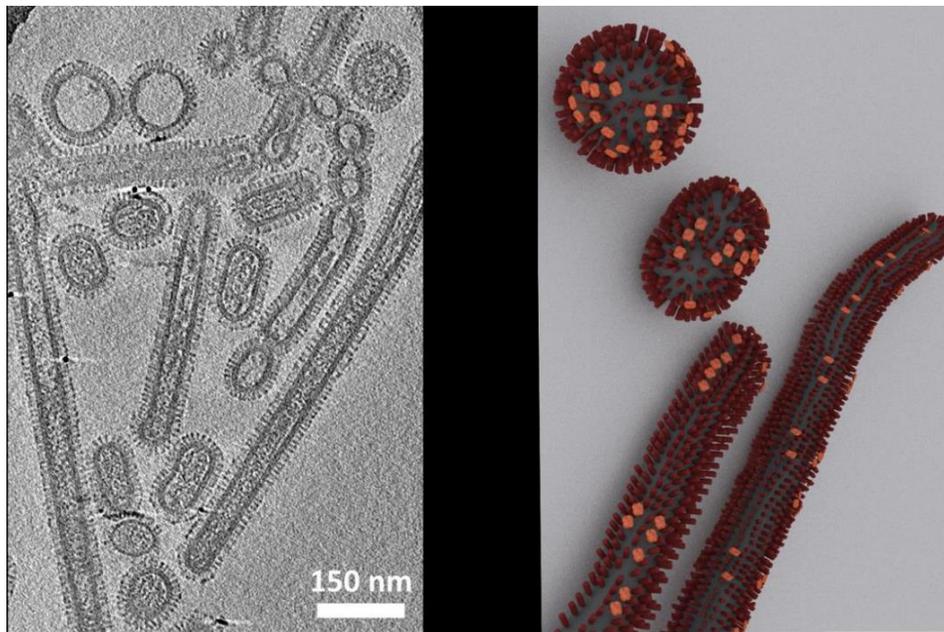


Figura 3. Morfología de viriones de Influenza, a la izquierda un tomograma crioelectrónico, a la derecha una representación artística de sus formas esférica, baciliforme y filamentosas (Tomado y editado de Hutchinson *et al.*, 2018).

El genoma de estos virus presenta gran plasticidad permitiendo marcos alternos de lectura en algunos segmentos dando así origen a las diferencias entre los géneros. En el virus de la influenza B está ausente la proteína M2, pero es reemplazada por la proteína de matriz NB proveniente del segmento seis, y una

proteína de membrana BM2 codificada por el segmento siete. Otra diferencia significativa es la PB1-F2, presente solamente en el género A (Piñón, 2013).

Cuentan con polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2) y polimerasa ácida (PA). Las primeras dos se encargan de sintetizar cadenas complementarias (ARNm) mientras que la tercera el RNA viral de sentido (-); las tres tienen una participación directa en la evolución viral a nivel de secuencias de nucleótidos, de aminoácidos, y en los perfiles de glicosilación. PB2 se asocia con la propagación viral y la virulencia. PB1-F2 induce la apoptosis mediada por las mitocondrias en células del sistema inmune. La nucleoproteína (NP) tiene la función de proteger el material genético (Figura 4) y llevarlo al núcleo, M1 promueve la interacción entre la superficie de la nucleocápside y el manto, M2 funge como canal iónico transmembrana; por su parte la NS2 se ve involucrada en el transporte de nucleocápsides recién formadas a la membrana celular (Batállanos, 2009).

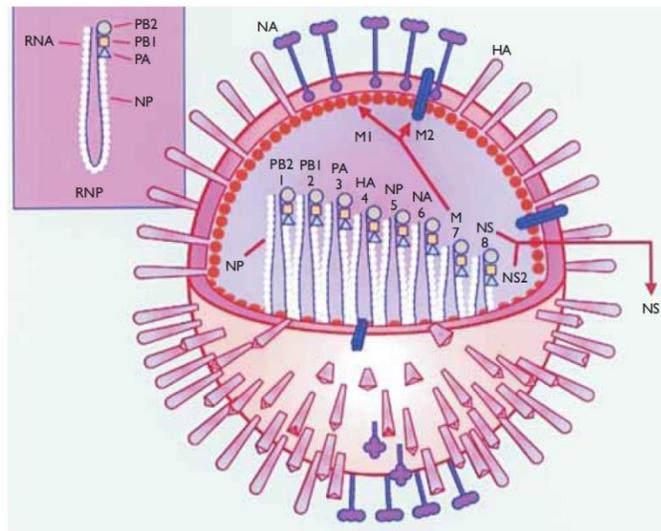


Figura 4. Estructura interna y externa del virión de influenza A (Tomado de Carrada, 2010).

1.5 Replicación del virus

El tropismo y la virulencia de los virus influenza están dados por las proteínas PB1, PB2, NS1 y PB1-F2 (Batállanos, 2009), pero las que más influyen son las dos que se encuentran como espículas en la superficie de la membrana del virión. La NA degrada las mucinas que recubren el epitelio del tracto respiratorio superior por su actividad sialidasa (Hutchinson, 2018; Piñón, 2013), en donde abundan los receptores con residuos de ácido N-acetilneuramínico (siálico) α -2, 6 (Piñón, 2013), a los que se une el antirreceptor HA que constituye el 80 % de las proyecciones en la superficie. Los carbohidratos en ella modulan la afinidad de la unión (Flores-Munguía *et al.*, 2007).

El proceso de replicación dura cerca de seis horas, y por lo regular culmina no sólo con la liberación de nueva progenie sino con la muerte de la célula (Couch, 1996). A diferencia de la mayoría de los virus con genoma de ARN que se replican en el citoplasma, los virus influenza lo hacen en el núcleo (Prats, 2013), y su proceso se divide en las siguientes etapas: Entrada a la célula, liberación e importe de la ribonucleoproteína viral (RNPv) al núcleo, transcripción y replicación del genoma viral, exportación de los nuevos RNPv fuera del núcleo, ensamblaje y salida de la membrana (Sanji, 2009).

Entrada a la célula: Una vez que se ha dado el reconocimiento inicial entre el ácido siálico de los receptores celulares y la HA, el virión es endocitado en una vesícula. El bajo pH del endosoma (5 o 6) beneficia el proceso de infección de dos maneras, primero la HA sufre un cambio conformacional liberando el péptido de fusión que se encarga de acercar ambas membranas; en segundo, los iones H^+ entran a la partícula a través del canal M2 para romper las interacciones proteína-proteína liberando las RNPv de la M1 de la cápside y tras fusionarse las membranas entran al citoplasma, Figura 5 (Bouvier y Palese, 2008).

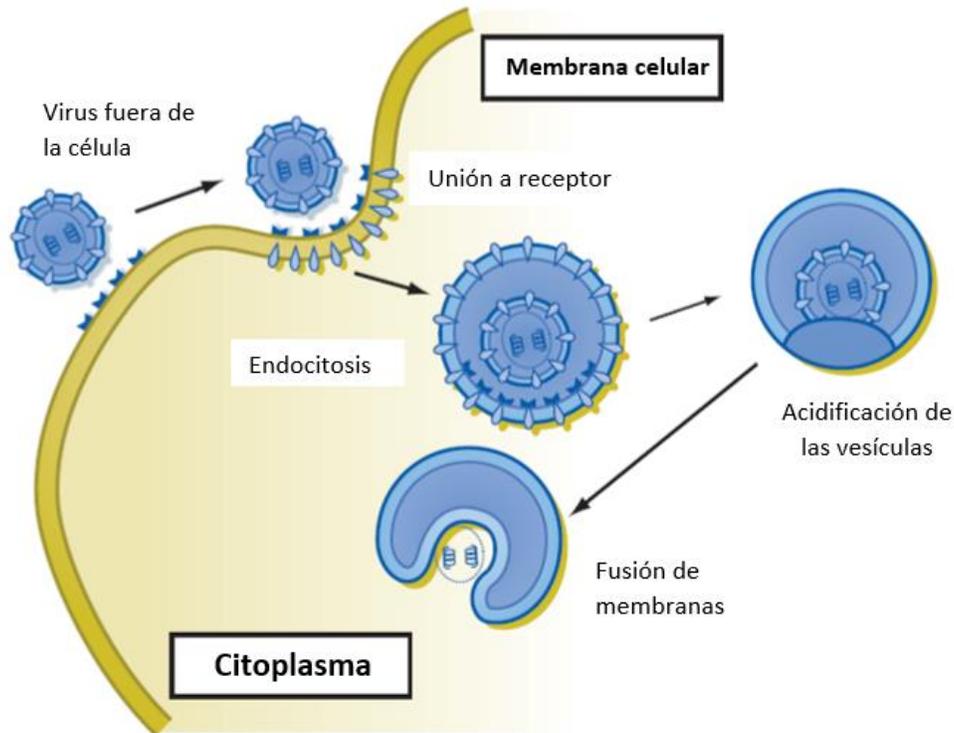


Figura 5. Esquema de las primeras etapas de la replicación mostrando la entrada por la vía más común, la endocitosis (Tomada y traducida de Cann, 2016).

Importe de RNPv al núcleo: Puede tomar una hora y es dependiente de la maquinaria celular; involucra importinas reclutadas por la NP que posee secuencias de localización nuclear (LNS) a las que se une la importina α y está a la importina β (Dou *et al.*, 2018).

Transcripción y replicación viral: Esta parte del proceso se da en dos fases, la expresión génica temprana y tardía. Previo a ello se da la transcripción primaria en que el material genético viral comienza a replicarse del que ingresó como una cadena complementaria. Durante la expresión temprana hay una síntesis preferencial de NP y NS1 (Bouvier y Palese, 2008; Dou *et al.*, 2018). En la fase tardía el ARN viral se sintetiza en partes equivalentes a las proteínas producidas y ocurre la transcripción preferencial de HA y M1. El inicio de la transcripción requiere de cebadores de los que carece el virión así que recurre a otras vías, toma los ARNm celulares maduros por un proceso llamado "Cap snatching" en el que interviene el complejo transcriptasa del virus (PB1, PB2 y PA). El inicio de la síntesis de las copias de ARN viral es posible debido a la complementariedad parcial inversa

en los extremos 5' y 3'. Algunos segmentos del genoma viral codifican para más de una proteína, ejemplo de esto son los segmentos siete y ocho que además de M1 y NS1, por un proceso de splicing dan origen a M2 y NS2 respectivamente, aunque en menor proporción (Sanji, 2009).

Para madurar los transcritos virales son poliadenilados por “stuttering” reiterativo y su traducción no ocurre en los mismos sitios (Figura 6), mientras que la de PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 y M1 tiene lugar en los ribosomas libres del citosol, la de HA, NA y M2 (proteínas de membrana) ocurre en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico (Dou *et al.*, 2018).

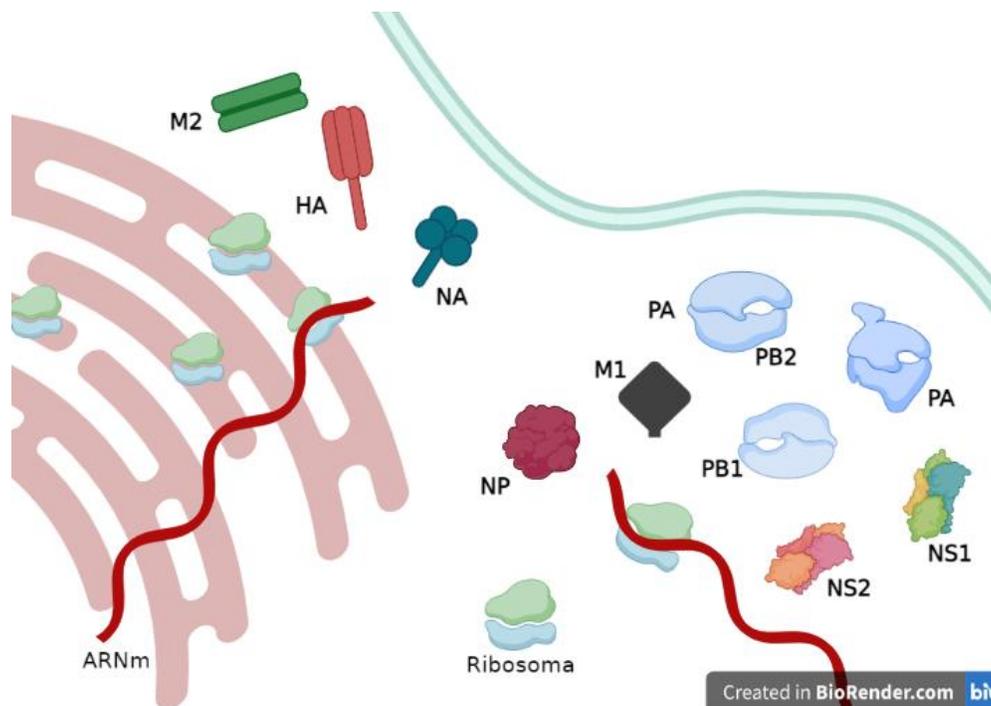


Figura 6. Traducción de los componentes del virus de influenza en ribosomas del citosol y de retículo endoplásmico (Imagen generada en biorender.com).

Una vez que las proteínas de membrana se han sintetizado pasan al aparato de Golgi donde ocurrirán las modificaciones postraduccionales, el plegamiento y adición de los carbohidratos que les confieren su actividad (Bouvier y Palese, 2008).

Armado y exportación de las RNPv (Figura 7): Las proteínas del complejo de transcripción/replicación, recién sintetizadas, poseen una señal nucleofílica que al igual que al inicio del proceso de infección los lleva al núcleo, a NP y PB2 de forma individual mientras que a PB1 y PA como heterodímero. Al interactuar con los ARNv se ensamblan las nucleocápsides (Dou *et al.*, 2018). Para su salida del núcleo el complejo transcriptasa se une a la proteína M1 que enmascara sus LNSs y así evita el reimporte mientras NS2 cumple el rol de adaptador entre el complejo NC-M1 viral y las nucleoporinas de la maquinaria de exportación nuclear (CRM1) (Dou *et al.*, 2018; Sanji, 2009).

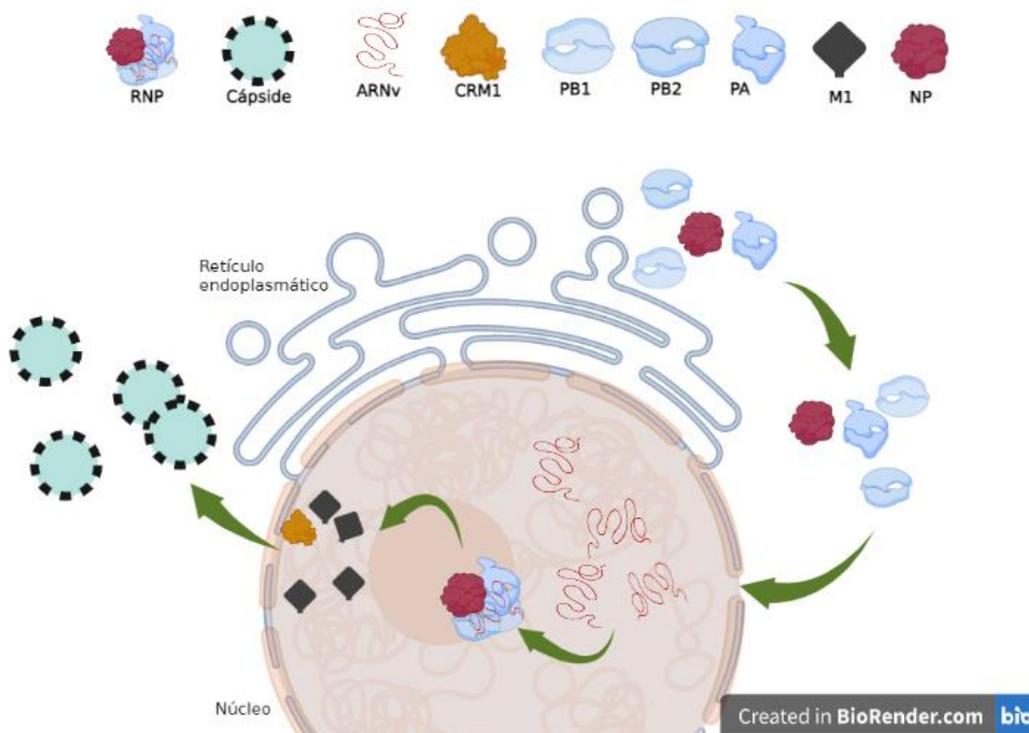


Figura 7. Ensamble de las RNPv en el núcleo y exporte de las cápsides en formación la cual terminará bajo la membrana celular (imagen generada en biorender.com).

Ensamblaje del virión: Las proteínas de membrana se insertan en la bicapa citoplasmática de la célula preferentemente en el extremo apical, a donde M1 llega por su afinidad a las colas citoplásmicas de HA y NA (Figura 8) llevando consigo a los RNPv con ayuda de la Rab11, de origen celular, que tiene afinidad a PB2, de esta manera se garantiza que los nuevos viriones cuentan con polimerasa, pero no

de que todos engloban un juego completo de su genoma. El proceso aún no está del todo claro, sin embargo, es muy probable que el empaquetamiento del genoma ocurra por especificidad (Dou *et al.*, 2018).

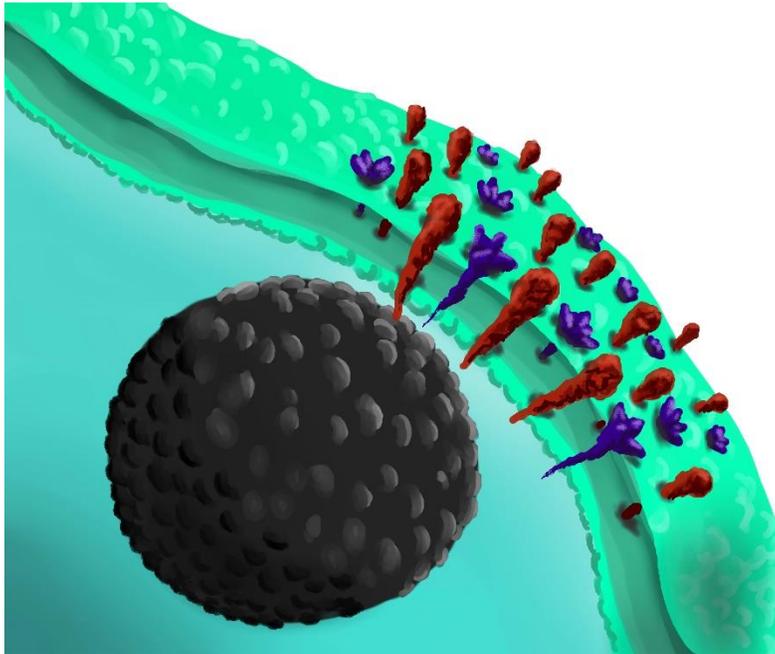


Figura 8. Acercamiento de la cápside a la membrana celular donde HA y NA ya se han insertado.

Brotamiento y liberación: Por gemación que probablemente inicia con la acumulación de la M1 en el lado citoplásmico de la membrana o bien por aglomeración y asociación de lípidos. A esto le sigue una constricción que separa la membrana celular de la envoltura viral recién tomada de su anfitriona. Permanecen acopladas por los receptores celulares y la HA hasta que la NA rompe estos enlaces, impidiendo así la aglutinación de la progenie, Figura 9 (Bouvier y Palese, 2008).

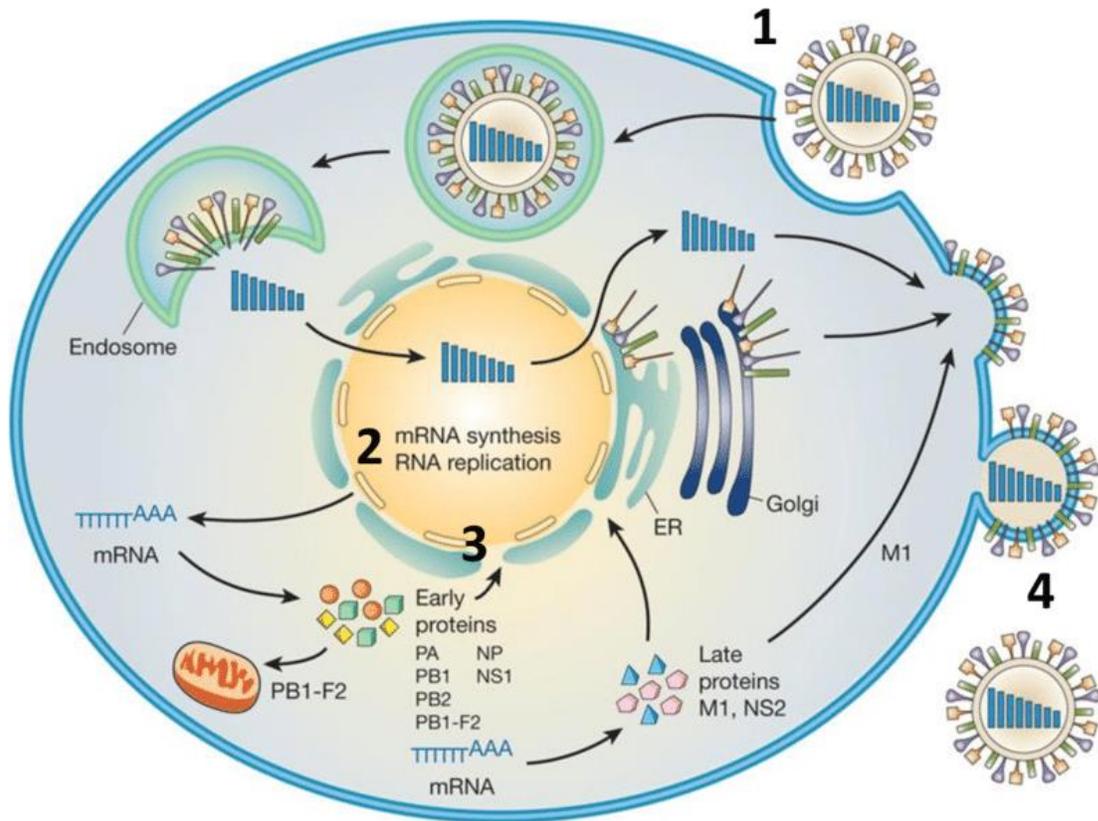


Figura 9. Esquema del ciclo de replicación del virus influenza: (1): Entrada del virus a la célula; (2): Transcripción y replicación; (3): Regulación de la expresión de genes; (4): Transporte y ensamblaje de los componentes del virión. <http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7249/images/nature08157-f2.2.jpg> 31 1.2.5. Nuevos productos génicos codificados por el genoma del virus influenza

1.6 Hemaglutinina

La HA (hemaglutinina) es descrita por Carrada (2010), como “una nanomáquina molecular citopática y mortífera diseñada para apuntar con precisión y atacar exitosamente las células respiratorias infectadas”.

Se trata de una glicoproteína de unión a receptor y de fusión de membrana (Skehel *et al.*, 2001). Su estructura fue determinada por el laboratorio Wiley en 1981 y desde entonces ha fungido a manera de modelo para el estudio del proceso general de entrada viral y fusión de membranas (Baker y Agard, 1994). La OMS ha determinado 18 subtipos que pueden agruparse en dos grupos; el primero incluye las HA 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11-13 y 16-18, en tanto que el segundo engloba a 3, 4, 7, 10, 14 y 15 (Wang *et al.*, 2020).

Su estructura es homotrimérica (Figuras 10 y 11), se encuentra embebida en el manto viral (Lorieau *et al.*, 2013), y posee un tamaño de 220 kDa (Wang *et al.*, 2020). Cada uno de los monómeros que lo componen está formado por dos subunidades polipeptídicas, la HA1 y HA2 con longitudes de 328 y 221 residuos, respectivamente (Ranaweera *et al.*, 2018) unidas por un puente disulfuro (Baker y Agard, 1994).

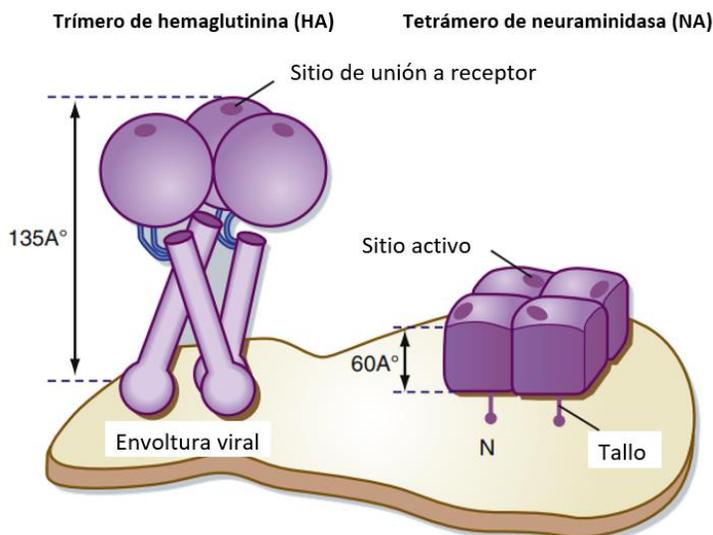


Figura 10. Las espículas de glucoproteínas en la superficie de los virus influenza (y otros envueltos) son multímetros que consisten de tres copias de la proteína HA (trímero) y cuatro copias de la proteína NA (tetrámero) (Tomada y traducida de Cann, 2012).

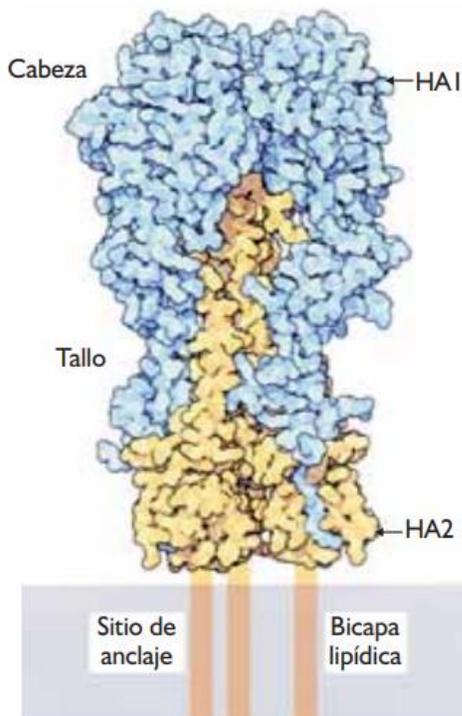


Figura 11. La HA en el virión se presenta en trímeros, cada monómero de esta glicoproteína está formada por dos péptidos glicosilados: HA1 (color azul) constituida por 329 aminoácidos y HA2 (color amarillo), de 221 aminoácidos; posee un dominio hidrofóbico que sirve como ancla (Tomada de Carrada, 2010).

En cada monómero HA1 forma una cabeza globular cuya función es el reconocimiento, es hipervariable, con varias cadenas de carbohidratos colgando que actúan como antígenos (Carrada, 2010); la HA del virus de la influenza B tiene cuatro grandes sitios antigénicos, los bucles 120, 150, 160 y la hélice 190 (Sun *et al.*, 2019).

Por otra parte la HA2 constituye un tallo formado por dos hélices beta carboxiterminal, una corta y una más larga unidas por una horquilla, con una región que se ancla a la envoltura viral (Carrada, 2010); se divide en un ectodominio soluble (SE), uno transmembrana (TM), un endodominio y un péptido de fusión (PF) (con longitudes de 160, 25, 10 y 25 residuos, respectivamente), altamente conservados en al menos 16 subtipos de HA y cuya actividad intramembrana es clave para el mecanismo de fusión (Qiao *et al.*, 1999; Lorieau *et al.*, 2013; Ranaweera *et al.*, 2018). El PF generalmente está insertado en el interior del núcleo hidrofóbico, se trata de la porción N-terminal de HA2 que tiene apariencia de bobina

enrollada (Skehel *et al.*, 2001; Lorieau *et al.*, 2013; Meher y Chakraborty, 2019), y permanece estable por la interacción entre residuos Trp21-Gly23 pero con una plasticidad estructural única, requerida por los cambios geométricos de la membrana durante la fusión (Meher y Chakraborty, 2019).

La HA pasa de su estado nativo y simple (HA0) al activo cuando el pH del entorno baja, se escinde en HA1 y HA2 que a la par se extiende para revelar el PF (Dyer y Eller, 2018), estos cambios conformacionales son irreversibles pues dan como resultado un estado de la proteína más termoestable que el anterior (Baker y Agard, 1994), a la que es similar salvo por 19 residuos del sitio de escisión (Skehel *et al.*, 2001), y la nueva forma de pinza de cabello que adopta (Ranaweera *et al.*, 2018).

Además de la pérdida de la cabeza globular, la proteína se vuelve muy sensible a proteasas (Baker y Agard, 1994), las hélices externas 38-55 y los bucles 53-75 pasan a formar hélices interiores, las internas 106-128 se vuelven las vueltas 106-109 y hélices externas 110-128. Las hélices 159-170 se acomodan como parte de las hebras 154-176 de la región de la pinza (Ranaweera *et al.*, 2018).

El PF realiza su función al quedar expuesto y proyectado hacia la cima de la proteína a la misma altura que la porción C-terminal (Weissenhorn *et al.*, 2007) y su naturaleza hidrofóbica le hace interactuar con la membrana del endosoma (Qiao *et al.*, 1999), insertándose en un ángulo de aproximadamente 35° con respecto a ella (Skehel *et al.*, 2001). Una vez el PF se ha unido a la membrana endosomal la porción C-terminal se vuelve hacia atrás llevando a la formación del nuevo estado de la proteína, con la región externa a modo de cremallera (Weissenhorn *et al.*, 2007), que se repliega acercando al PF al dominio transmembrana (TM) (Figura 12) recorriendo la estructura en forma de varilla y aproximando por lo tanto cada membrana (Dyer y Eller, 2018).

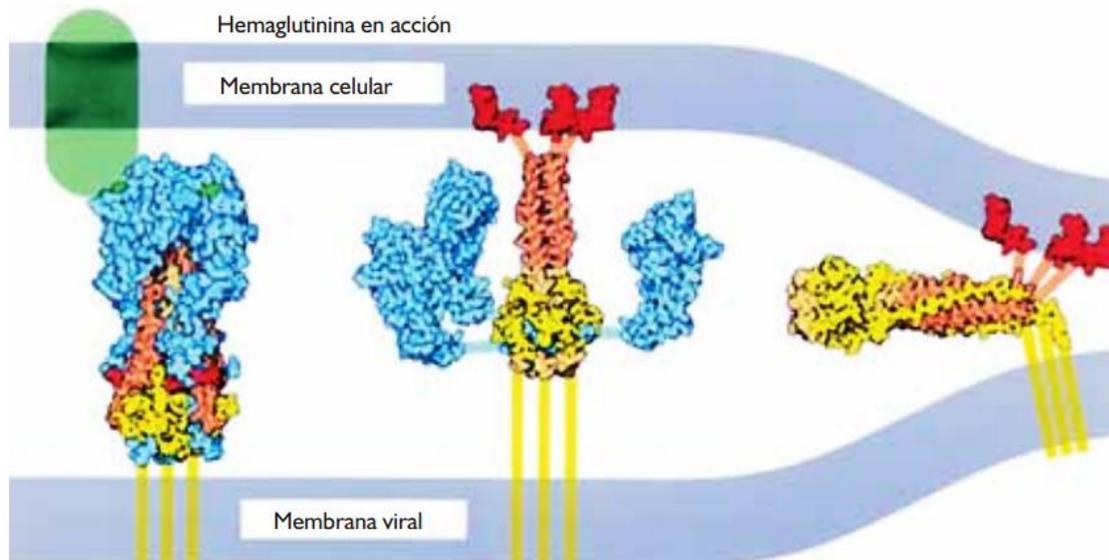


Figura 12. Izquierda: HA anclada sobre la envoltura viral se liga con el sialorreceptor (color verde). Centro: el péptido de fusión expuesto (color rojo) se pega fuertemente con la membrana celular. Derecha: la HA se repliega retorciéndose, aproximando así la membrana celular con la envoltura viral, para fusionarse (Tomado de Carrada, 2010).

1.7 Evolución

Los virus de la influenza evolucionan como lo hacen los seres vivos, por acumulación continua de mutaciones puntuales en cada uno de los ocho segmentos de su genoma que resultan en la aparición periódica de variantes virales que pueden convertirse en una cepa estacional (García-García y Ramos, 2006; Nucamendi, 2014). Las dinámicas evolutivas entre ambos géneros son similares, incluyen sustituciones no sinónimas en sitios antigénicos de HA y reordenamientos entre linajes (Valesan *et al.*, 2020), hay sustituciones, inserciones y deleciones que son errores de la ARN polimerasa que con cada ciclo de replicación se acumulan generando variantes de estructura y función de sus proteínas que podrían servirle para adaptarse a sus hospederos y resistir las condiciones ambientales. Puede

haber mutaciones desde irrelevantes hasta aquellas que implican alteraciones en el comportamiento biológico (García-García y Ramos, 2006).

Existen dos procesos principales mediante los cuales se dan estos cambios, el primero consta de cambios antigénicos menores, deslizamiento antigénico (antigenic drift), que tienen lugar en las proteínas de superficie HA y NA, cambiando las secuencias de sus epítomos, resultado de la selección de mutantes con alta frecuencia y que aseguran la renovación constante de hospederos susceptibles en las poblaciones. El segundo tipo de variaciones son el desplazamiento o cambio antigénico mayor (antigenic shifts), en esencia es el reemplazo total de las proteínas de superficie HA o NA dando origen a nuevas cepas; son menos frecuentes y el resultado de una coinfección en que las proteínas o segmentos de los virus involucrados se asocian aleatoriamente durante el ensamblaje (Manjarrez y Arenas, 1999).

A pesar de que las fuerzas que dirigen su evolución son las mismas, existe gran diferencia en la velocidad. El virus de la influenza A se adapta y diversifica más rápidamente, lo que podría deberse a la selección positiva que la presión inmune ejerce sobre HA (Koutsakos *et al.*, 2016). Una posible explicación del porque el tipo de influenza B evoluciona lentamente es que sus epítomos son muy estables convirtiéndose en regiones conservadas y por tanto restricciones genéticas, así que regiones de la HA del virus de influenza B como el dominio globular son menos susceptibles a sufrir mutaciones, es decir que son más robustos mutacionalmente, esto justificaría su limitada diversidad de hospederos (Fulton *et al.*, 2018; Valesan *et al.*, 2020).

Entre los linajes del tipo B también existen diferencias dinámicas. El linaje B Victoria exhibe gran diversidad entre temporadas a causa de un drift antigénico más fuerte por lo que poseen más sustituciones de aa en o cerca del receptor de HA, por tanto, los clados del linaje B Yamagata circulan por más tiempo que los de B Victoria que lo hacen por uno o tres años antes de ser reemplazados por otros (Koutsakos *et al.*, 2016).

1.8 Linajes

A principios de la década de 1980 el gen de HA en el virus de la influenza tipo B sufrió cambios evolutivos que le llevaron a divergir en dos linajes filogenética y antigénicamente distintos, representados por los virus B/Victoria/2/87 y B/Yamagata/16/88, linaje Victoria y Yamagata, respectivamente (Rivas, 2020), con similitud de más del 97 % (Sharabi *et al.*, 2016). Aunque el linaje Victoria circuló limitado a Asia en la década de 1990, en el siglo XXI han cocirculado por todo el mundo (Caini *et al.*, 2019). Los patrones de estos se ven determinados por las condiciones ambientales, mientras el linaje Victoria (B/Vic) es más frecuente en países tropicales, el linaje Yamagata (B/Yam) domina las regiones templadas en ambos hemisferios; la razón no es clara, pero se sospecha que su supervivencia y transmisibilidad se ve diferencialmente afectada por el frío y la humedad (Caini *et al.*, 2019)

Ambos linajes han mostrado poseer diferentes dinámicas de transmisión y antigenicidad llevándolos a alternar en cuanto a la dominación regional y los grupos susceptibles a su infección (Rivas, 2020).

1.9 Epidemiología

Debido a las características de estos virus, sus patrones de circulación y dinámicas evolutivas, es que no se le considera una enfermedad que se pueda erradicar (García-García y Ramos, 2006). Es por su distribución a nivel global e impacto en la calidad de vida y productividad de la sociedad que los virus que la causan son considerados el mayor problema de salud humana (Rivas, 2020).

La OMS estima que entre las epidemias de temporada y ocasionales pandemias que provoca se registran hasta mil millones de casos al año, cifra que se aproxima al 15 % de la población mundial, de estos entre tres y cinco millones son severos requiriendo algunos de hospitalización, derivando en 250 mil o 500 mil muertes. En

cuanto al costo económico las estimaciones se acercan a los 90 mil millones de dólares (OMS, 2009; Nucamendi, 2014; Fang *et al.*, 2020).

La influenza afecta a todos los grupos etarios, pero de forma preferente a adultos mayores de 65 años, pacientes con factores de riesgo (crónicos y demás comorbilidades), y niños menores de cinco años que presentan la mayor tasa de muerte (Solórzano-Santos, 2009; CNETS, 2015).

En países de clima templado se reporta que la temporada de influenza se ubica a lo largo de los meses de otoño e invierno donde es más marcada pero pueden ocurrir casos aislados y brotes esporádicos entre temporadas; en los trópicos y cerca de ellos se presentan casos todo el año de una manera más uniforme (Saldías, 2013), estos brotes dependen de la combinación de factores como individuos susceptibles a la infección, condiciones ambientales y la naturaleza del virus mismo; su permanencia en el ambiente se dará por otras, el frío y el hacinamiento por ejemplo (Baehr y Mackenney, 2014). México no es la excepción a estos patrones de circulación, en nuestro país los virus se distribuyen igual que en el resto del hemisferio norte (otoño a invierno) (Franco-Paredes *et al.*, 2006). El punto de inicio y duración varían con cada temporada, pero por lo regular empiezan en septiembre u octubre, alcanzando su pico máximo en enero o febrero y pueden extenderse hasta mayo (Nucamendi, 2014) y junto con la neumonía representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad quedando en el séptimo o noveno puesto (Solórzano-Santos y Miranda Novales, 2009).

De 2010 a 2016 el 53.5 % de los casos confirmados en el país se trataron de mujeres de las cuales el 77 % no tenían antecedente de vacunación y 36 % presentaban alguna comorbilidad (Ruiz-Matus *et al.*, 2017) de 2015 a 2016 se reportaron 9,721 con 537 muertes (Prado-Calleros y Prado-Abarca, 2018).

Respecto al virus de la influenza B, es el causante de aproximadamente el 29 % de las muertes por temporada alrededor del mundo (Fang *et al.*, 2020), tiende a dominar los meses de primavera, previos al pico máximo de contagios (Mandala *et al.*, 2019). Por lo regular producen infección y enfermedad durante la infancia así que es en pacientes infantiles donde se detecta una carga viral (Solórzano-Santos y

Miranda Novales, 2009; Banerjee *et al.*, 2018). Aun con esto su impacto se considera menor que el de los virus de influenza A pues su lenta evolución y falta de hospederos contribuyen a la baja frecuencia de la ocurrencia de epidemias. Las condiciones ambientales podrían estar involucradas en la diferente distribución temporal pues su eficiente propagación epidemiológica se ve dirigida por su capacidad de transmitirse a través del aire en aerosoles respiratorios o bien permanecer sobre superficies; una de esas condiciones es la humedad relativa (RH) jugando un rol importante en la infección al propiciar o no el microambiente adecuado en las vías respiratorias (Honemann *et al.*, 2019; Kormuth *et al.*, 2019).

Entre los linajes del virus de influenza B también existen diferencias en sus patrones de distribución. Ambos circulan anualmente, pero tiende a haber predominancia de uno de ellos dependiendo de factores como su evolución previa, la cobertura de vacunación y los niveles de anticuerpos o defensas de los individuos (Laurie *et al.*, 2018). De acuerdo a la edad los virus B/Vic tienden a distribuirse, a lo largo de una curva unimodal con un pico entre los 10 y 20 años (Caini *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019), mientras que el linaje B/Yam afecta principalmente a la población mayor, cercana a los 50 años. Ambos linajes han contribuido a las 290-650 mil muertes al año por influenza (Virk *et al.*, 2020).

En Estados Unidos de 1976 a 1999 la influenza B estuvo entre las tres causas principales de morbilidad, solo después de la influenza A (H3N2) y antes de la influenza A (H1N1) pdm09. De 1997 a 2009 fueron la causa del 29 % de las muertes. En Australia poco más de la mitad de casos reportados de influenza (54 %) fueron diagnosticados como Influenza B y su mayoría fueron infantes, de modo similar a lo ocurrido en Inglaterra donde durante la primera mitad de la temporada 2012-2013 predominó la influenza B, especialmente en niños de cinco a 14 años. En Tailandia las edades más afectadas fueron de los cinco a 19 años (Koutsakos *et al.*, 2016).

En el caso de los países americanos cercanos a los trópicos los patrones de circulación no parecen tan marcados a comparación de los del hemisferio norte y sur, sin embargo, México y Perú cuentan con el patrón de circulación del hemisferio norte donde la epidemia ocurre a inicios de febrero mientras que en el resto de

países tropicales entre abril y septiembre, la razón recae en el hecho de que ambos países son ecológicamente diversos y distintos del resto de la América tropical y la evidencia previa ha demostrado diferencias en la actividad epidémica entre distintos climas (Durand *et al.*, 2015).

1.10 Sintomatología

Aunque los signos clínicos de una infección por el virus de influenza son muy parecidos a los del resfriado común es importante aclarar que contrario a la idea general de que son la misma enfermedad el resfriado común o catarro puede ser causado por múltiples virus, además el cuadro sintomático de la influenza es más severo y con un inicio generalmente abrupto (Franco-Paredes *et al.*, 2006; Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2009), los síntomas, producto, de la infección pueden ser de dos tipos, por acción directa del virus sobre el epitelio del tracto respiratorio, conocidos como locales y a distancia debido a la actividad de citocinas inflamatorias en respuesta a la infección (Baehr y Mackenney, 2014). Este cuadro va desde leve que no precisa más que un tratamiento ambulatorio hasta graves con una falla respiratoria aguda capaz de causar la muerte, por lo regular es autolimitante y sus manifestaciones incluyen fiebre de 38 °C o 40 °C, tos, cefalea, mialgia, postración, dolor de garganta, odinofagia, rinorrea, fatiga, artralgia, ataque al estado general perdurando de uno a cinco días (Manjarrez y Arenas, 1999; Saldías, 2013).

Estos síntomas varían en función de la edad, otra diferencia es que aún cinco días después de la recuperación los adultos pueden seguir teniendo el virus mientras que en los niños este estado puede durar siete o diez días y prolongarse más allá de este tiempo (28 a 30 días) si se trata de pacientes crónicos o inmunocomprometidos (Nucamendi, 2014; Banerjee *et al.*, 2018). Otros síntomas asociados, aunque menos recurrentes son el dolor retroesternal, fotofobia, dolor abdominal, diarrea y convulsiones causadas por fiebre alta en niños. En grupos de

alto riesgo como inmunodeprimidos la infección puede propiciar complicaciones severas, las neumonías secundarias son ejemplo de ellas, causadas principalmente por tres géneros de bacterias *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*; también lo son la sinusitis bacteriana, bronquitis, traqueobronquitis y otitis media; se han reportado complicaciones asociadas al sistema nervioso central, mielitis transversa y síndrome de Guillain-Barré por ejemplo (Franco-Paredes *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2020).

La enfermedad causada por el virus de la influenza B es indistinguible de la causada por el virus de influenza A, pero pueden diferir en algunas complicaciones y es que las relacionadas con la influenza B son de naturaleza neurológica, muscular y cardiológica, estas últimas son más frecuentes en jóvenes que en adultos. Otra diferencia es que en los casos fatales aquellos con diagnóstico de influenza B fallecieron más rápido que con influenza A. En niños los síntomas son más prevalentes, particularmente cuando la infección es por B/Vic, lo que se explicaría por la alta expresión de glicanos de ácido siálico alfa 2-3, superior a la encontrada en adultos (Koutsakos *et al.*, 2016).

1.11 Respuesta Inmune

El reconocimiento innato de la infección por influenza B ocurre pronto, más rápido que la detección de una infección por el género A (2-4 h/8-16 h respectivamente), gracias a las células dendríticas, posterior a ello se produce la respuesta de interferones (IFN) tipo I y III (IFN alfa, beta y gama 1) así como de citocinas y quimiocinas (CXC L10, CXC L8, CCL5, CCL2, IL1-beta, IL-18, IL-6). La mayoría de anticuerpos actúan contra HA y NA, en el caso de la primera se le unen para bloquear sus cambios conformacionales e impedir la fusión de membranas (Koutsakos *et al.*, 2016).

Durante la fase aguda de la infección hay inducción de IFN alfa en la secreción respiratoria y el suero de los pacientes conduciendo a la formación de anticuerpos

en las mucosas que recubren el epitelio y que desempeñan dos funciones principales, la neutralización de la infección e interferencia en la liberación de la progenie viral. Las IgG, IgA y células T citotóxicas CD8 se producen tres o cuatro días después dirigidas contra HA, NP, PB2 y M2 (García-García y Ramos, 2006). Proteínas como CR8071 o CR8033 son capaces de neutralizar ambos linajes del virus B al opsonizar los residuos conservados de la base del dominio globular y el sitio de unión a receptor, respectivamente, de HA (Fulton *et al.*, 2018).

El virus es capaz de contrarrestar estas acciones del sistema inmune para garantizar su éxito por medio de la NS1 que al prevenir la activación de IRF3 y su posterior translocación al núcleo de la célula infectada bloquea la respuesta de IFN alfa y beta (Koutsakos *et al.*, 2016).

1.12 Tratamiento

Existen recomendaciones generales aplicadas al cuidado de pacientes que padecen influenza que son la reducción de la actividad física, permanecer en reposo durante el periodo febril (uno a tres días), aislamiento y apropiadas medidas de higiene con el fin de evitar más contagios, ingesta de abundantes líquidos, antipiréticos para manejar la fiebre, uso de analgésicos y antiinflamatorios siempre y cuando estos no sean derivados de salicilatos, especialmente si se desea tratar una infección por influenza B (Franco-Paredes *et al.*, 2006; Saldías, 2013). Con estas medidas y en ausencia del tratamiento prescrito la recuperación del paciente se dará en una semana, o dos si se le considera en un grupo de riesgo (Nucamendi, 2014). El uso de antibióticos solo se recomienda en caso de presentarse infecciones bacterianas secundarias (García-García y Ramos, 2006).

Hay fármacos para tratar la enfermedad, los inhibidores de NA son análogos al ácido siálico, actúan contra los virus de influenza A y B atacando los residuos conservados de aa en dicha proteína con el objetivo de inhibir completamente su actividad enzimática bloqueando así el término de la replicación, ejemplo de esto

son el oseltamivir y el zanamivir (Franco-Paredes *et al.*, 2006; Koutsakos *et al.*, 2016; Farrukkee *et al.*, 2018; Ison, 2017).

Los adamantanos como amantadina y rimantadina inhiben a M2 cristalizandola y bloqueando su poro transmembrana, pero no son recomendables contra infecciones por influenza B ya que la diferente secuencia de aa del dominio transmembrana de esta proteína lo vuelve inefectivo (Krol *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2019), por esta razón se han desarrollado nuevos fármacos (Cuadro 1) para tratar estas infecciones, uno de ellos es el Favipiravir, capaz de impedir la replicación de los tres géneros del virus influenza, reduce la carga viral en el tracto respiratorio superior y en el pulmón disminuyendo el daño a este al igual que la tormenta de citocinas, por ello se recomienda combinarlo con inhibidores de NA (Fang *et al.*, 2020).

Cuadro 1.- Dosis diarias recomendadas de los antivirales contra influenza tanto en tratamiento como quimioprofilaxis de acuerdo a grupos etarios.

Antiviral	1-6	7-9	10-12	13-64	>65
• Amantadina -Tratamiento influenza A -Profilaxis influenza A	5 mg/Kg/día, hasta 150 mg dos veces al día	5 mg/Kg/día, hasta 150 mg dos veces al día	100 mg dos veces al día	100 mg dos veces al día	100 mg al día
• Rimantidina -Tratamiento influenza A -Profilaxis influenza A	NA 5 mg/Kg/día hasta 150 mg dos veces al día	NA 5 mg/Kg/día hasta 150 mg dos veces al día	NA 100 mg dos veces al día	100 mg dos veces al día ^^	100 mg al día
• Zanamivir -Tratamiento influenza A y B	NA	10 mg dos veces al día	10 mg dos veces al día	10 mg dos veces al día	10 mg dos veces al día
• Oseltamivir -Tratamiento influenza A y B -Profilaxis influenza A y B	Según peso del niño *	Según peso del niño	Según peso del niño *	75 mg dos veces al día	75 mg dos veces al día
	NA	NA	NA	75 mg al día	75 mg al día

Los números arriba indican edades. * La dosis recomendada para niños es de acuerdo al peso: < 15 kg: 30 mg, dos veces al día; 15 a 23 kg: 45 mg, dos veces al día; > 23 a 40 kg, 60 mg, dos veces al día; > 40 kg: 75 mg, dos veces al día. ^^ Se recomienda reducir la dosis a 100 mg por día para personas con disfunción hepática o aquellos con depuración de creatinina menor a <10 ml / min (con amantadina y rimantadina). * Amantadina y

rimantadina por el alto porcentaje de resistencia ya no son antivirales recomendados para el tratamiento de influenza (Tomada de Franco-Paredes *et al.*, 2006).

La resistencia que encuentran los amantadinos es resultado de una sencilla sustitución de aa en M2, particularmente en el residuo Ser 31 Met, lo cual se ha detectado en más del 95% de los virus resistentes. Hay otras mutaciones en los residuos S141N y G185A de HA para compensar los cambios del amino adamantil sobre el pH. Por otra parte, los inhibidores de NA encuentran menor resistencia que los primeros, en este caso debido a mutaciones que incluyen sustituciones en NA y HA que reducen la afinidad al inhibidor o la afinidad de HA por las proteínas sialiladas. Ahora bien, estos cambios pueden ser la consecuencia directa de la presión selectiva por parte de los medicamentos o estar relacionadas con fuerte brotes de influenza humana (influenza B) y que se fijan en uno u otro tipo de virus con mayor o menor afinidad. Actualmente la mayoría de los virus influenza circulantes son resistentes a los medicamentos más comunes anteriormente usados, al menos desde el 2009 se detectaron virus resistentes a oseltamivir en Europa y USA. Los brotes de influenza aviar en el sur de Asia y la Ciudad de México son ejemplos claros de la habilidad que poseen de mutar y desarrollar resistencia rápidamente (Astrahan y Arkin, 2011; Krol *et al.*, 2014).

Es importante estar al tanto de estas mutaciones para desarrollar nuevos antivirales y combinaciones que aumenten su potencia y reduzcan la resistencia (Ison, 2017)

1.13 Prevención

El contagio se da de persona a persona a través de gotitas de saliva que transportan a los viriones y pueden perdurar en superficies lisas por 48 o 72 h (Ruiz-Matus *et al.*, 2017), así que la mejor manera de prevenir la enfermedad es evitar su propagación, lo que se logra a través de medidas diarias y comunes como el cubrirse con el antebrazo al toser o estornudar, lavarse frecuentemente, evitar tocarse los ojos, nariz y boca, igual que evitando estar cerca de personas enfermas y el hacinamiento, el recambio constante de aire en espacios cerrados, llevar una vida saludable, previniendo el tabaquismo y la exposición a la contaminación (Saldías, 2013).

El uso de vacunas es una medida elemental de prevención con el fin de lograr la inmunidad de rebaño; existen trivalentes que incluyen dos cepas del virus de influenza A y una del virus de influenza B, y las tetravalentes, con dos cepas de influenza A y dos de influenza B, formuladas con base en las cepas que circularon la temporada anterior, las hay de varios tipos, inactivada, de subunidades y de antígenos purificados (García-García y Ramos, 2006). La vacunación de grupos de riesgo es el principal objetivo, evitando el 72 % de hospitalizaciones y 87 % de muertes, en México estos grupos son el personal de salud, aquellos que trabajan en asilos y guarderías, mujeres con embarazos de alto riesgo, mayores de 65 años, niños de seis meses a cinco años, viajeros y pacientes crónicos (Franco-Paredes *et al.*, 2006; Carrada, 2010), sin embargo, en la última década ha existido discordancia entre la vacuna trivalente y las cepas circulantes y su efectividad contra el virus B fue solo del 54 % (Koutsakos *et al.*, 2016; Farrukee *et al.*, 2018).

Por esto desde 2013 la OMS ha recomendado el incluir una segunda cadena de influenza B de modo que se cubran ambos linajes, es decir formular la vacuna tetravalente y es que incluso trabajadores del área de la salud recurren al acertado argumento de las mutaciones del virus como una razón para estas discordancias (Rizzo *et al.*, 2018 y Lorene *et al.*, 2017).

Es importante señalar que la eficacia de una vacuna, que recientemente ha parecido inefectiva está limitada por las condiciones virológicas y biológicas en

juego; estas son los factores relacionados al hospedero (concerniente al sistema inmune), los de la vacuna (relacionados a su transporte, almacenamiento y administración), del patógeno al que se pretende combatir, en los que entran precisamente las mutaciones que les permiten evadir las defensas por ello es que se requiere una vacuna anual y puede percibirse como inefectividad; también intervienen las condiciones geográficas, ecológicas y demográficas que facilitan la circulación de uno u otro clado. Por poner un ejemplo, en un grupo etario igual o mayor a los 75 años la seroprotección de la vacuna contra la influenza es de solo el 29 a 46 %, inferior cuando se le compara con la que proporciona a aquellos con entre 60 y 74 años que es del 41 al 58 %, de modo que la cobertura de vacunación es muy variable y por desgracia el incremento de esta no es garantía de efectividad (Poland, 2018; Smetana *et al.*, 2018).

1.14 Vigilancia epidemiológica

La OMS cuenta con un programa de investigación en materia de salud pública sobre la influenza que se enfoca a áreas particularmente relevantes que son: reducción del riesgo de aparición de nuevos virus con potencial pandémico, limitación de la influenza en sus variantes pandémica, zoonótica y epidémica estacional, minimización de su impacto, optimización del tratamiento de pacientes, promoción del desarrollo y la aplicación de instrumentos modernos de salud pública (OMS, 2009). A nivel global FluNet es la plataforma para la vigilancia de la influenza, alimentada por los datos que proporcionan los centros nacionales de influenza (CNI), de la vigilancia de la influenza global y sistemas de respuesta (GISRS), y demás laboratorios de referencia; en 2014 sumaban 125 instituciones en 96 países que cada año recomiendan a la OMS el contenido de la siguiente vacuna estacional y vigilan la aparición de nuevas cepas con potencial pandémico monitoreando su evolución y establecen medidas y protocolos que ayuden al control de epidemias o pandemias asegurando el funcionamiento óptimo de los sistemas y servicios elementales en tal eventualidad (Nucamendi, 2014).

En México, las acciones de vigilancia están a cargo de la Secretaría de Salud a través de un sistema centinela denominado Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Respiratorias (SISVER), que integra el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), coordinado por la Dirección General de Epidemiología (DGE) (CNETS, 2015) quien se encarga de dirigir a las 475 Unidades de Salud Monitoras de Enfermedades Respiratorias (USMER), que han de captar los casos probables de influenza y envían las muestras a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública y Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica para realizar el diagnóstico y capturar toda la información epidemiológica en la plataforma SISVER, a su vez, esta red hace llegar muestras para su caracterización al Laboratorio de Virus Respiratorios del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, reconocido como Centro Nacional de Influenza desde 1951 y que por tanto administra la vigilancia epidemiológica por medio de dicha red.

II. Antecedentes

2.1 Nueva variante con Doble delección

En junio de 2017 se reportaron dos virus B/Vic noruegos antigénicamente diferentes al presente en la vacuna estacional (B/Brisbane/60/2008), pertenecientes al clado 1A, y tras su secuenciación se confirmó la presencia de una delección de seis nucleótidos en el gen de HA, en las posiciones 529-534, lo que originó una doble delección de aa (posición 162-163) en la HA1 (Daniels *et al.*, 2017; Shu *et al.*, 2020). Este virus cuenta con sustituciones adicionales en D129G, I180V en HA1 y R151K en HA2; hasta 2017 se había detectado en Canadá, Trinidad y Estados Unidos (Daniels *et al.*, 2017).

Poco después por evolución paralela emergieron dos variantes del mismo clado (V1A.2 y V1A.3) con una delección de nueve nucleótidos en el mismo gen (529-537) derivando en una triple delección de aa en la posición 162-164, además de contar con sustituciones adicionales en I180T y K209N de HA1, los cuales fueron representados por el virus B/HongKong/269/2017 y que se han detectado en Asia, África, América y Europa (Daniels *et al.*, 2017; Shu B. *et al.*, 2020).

Los virus con doble delección (subclado V1A.1) mostraron poca reactividad con los antisueros desarrollados contra los virus B/Vic sin delección (Daniels *et al.*, 2017). Mientras que V1A.3 a pesar de ser genéticamente diferente mostró reactividad cruzada en estudios serológicos conducidos en humanos vacunados con V1A.1 (Owusu *et al.*, 2020).

Ahora no solo hay dos sino cinco genes de HA (Figura 13) de virus de influenza B que están cocirculando en el mundo: B/Yam, B/Vic, B/Vic V1A.1, B/Vic V1A.2 y B/Vic V1A.3 (Shu *et al.*, 2020). Tan solo en Estados Unidos, entre mayo y septiembre de 2019 se detectaron casos causados por las tres nuevas variantes de virus con delecciones en la HA (Owusu *et al.*, 2020).

Los cambios en HA son importantes puesto que su reconocimiento específico permite al virus infectar, replicarse y perpetuarse estableciendo reservorios naturales en diferentes especies con el tiempo (Flores-Mungía *et al.*, 2007).

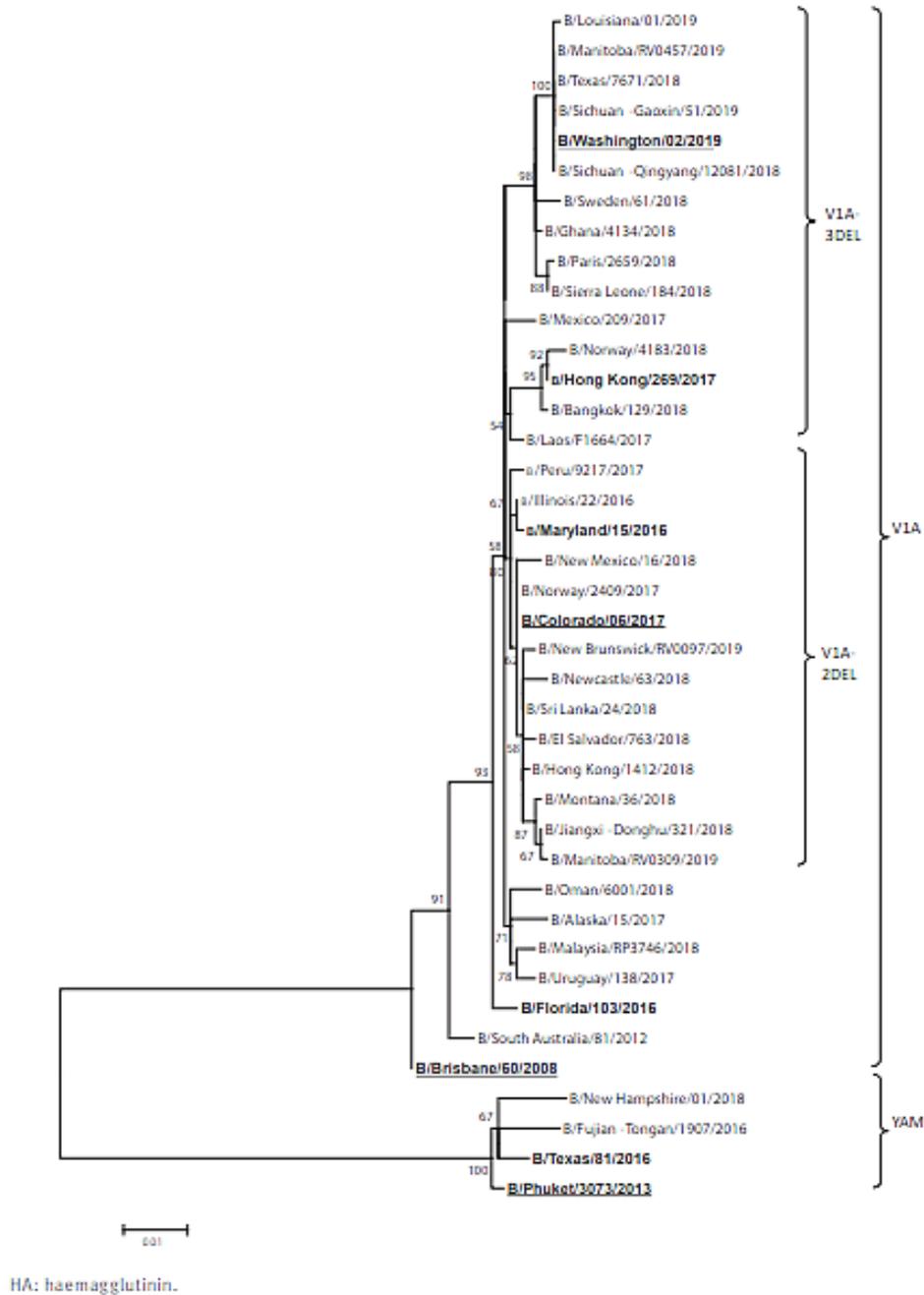


Figura 13. Árbol filogenético de HA con los virus representativos de los grupos genéticos de los linajes B/Victoria y B/Yamagata. El clado V1A, y subclados V1A-2DEL (V1A.1) y V1A-3DEL (V1A.2 o V1A.3) están señalados por las barras a la derecha (Shu *et al.*, 2020).

2.2 Circulación global

Durante la temporada de 2017-2018 en el hemisferio norte el linaje Yamagata fue predominante (B/Yamagata/16/88), particularmente en Europa y Asia. El linaje B/Vic, clado V1A fue detectado en algunas regiones a niveles muy bajos. El subclado V1A.1 continuó disperso geográficamente y pasó a ser el virus predominante del linaje Victoria en América y Europa. Un pequeño número de casos causados por virus del clado V1A con triple delección fue detectado en Asia y África (CDC, 2018).

Durante 2018 el linaje Yamagata predominó sobre los demás virus del género B en Europa y Asia. El subclado V1A.1 avanzó y predominó en América y Europa. Uno de los virus de este subclado fue incluido en la vacuna de la temporada 2018-19 (B/Colorado/06/2017) para el hemisferio norte. En Asia y África se encontraron los virus con una triple delección de aa (V1A-3Del). En la temporada 2018-2019 la detección de virus del tipo B fue muy baja en contraste con la del tipo A. El análisis filogenético reveló que los virus del linaje B/Vic de diferentes subclados estuvieron cocirculando expresando HAs con doble y triple delección (CDC, 2019).

A diferencia de la temporada anterior, en 2020, en el hemisferio norte los virus de tipo B circulan en mayor proporción que los de tipo A, especialmente en América, Europa, Asia central y oeste. Todas las muestras caracterizadas por el CDC en esa temporada pertenecían al clado V1A, subclados V1A.1, V1A.2 y V1A.3; el último incrementó su proporción entre 2019 y 2020 demostrando cierta predominancia (CDC, 2020).

III. Justificación

La velocidad con que los virus de la influenza pueden evolucionar les convierte en un objetivo de constante interés y por tanto es de vital importancia conocer el comportamiento de las cepas emergentes, los virus pertenecientes al subclado V1A.1 del linaje Victoria son un ejemplo de ello. Si bien los virus causantes de la influenza tipo B no representan riesgo elevado a comparación de los del tipo A no debe bajarse la guardia con respecto a su vigilancia.

IV. Hipótesis

Dada la importancia de la HA en el ciclo biológico e infeccioso de los virus de influenza es posible que existan diferencias entre aquellos del tipo B linaje Victoria, con doble delección de aa en esta proteína (subclado V1A.1) y los que no presentan dicha modificación, con respecto a sus patrones de circulación, esto es, los grupos etarios más afectados, comportamiento estacional y proporción entre sexos; así como en el cuadro de enfermedad que causan, sintomatología y evolución de los casos clínicos.

V. Objetivos

5.1 General

Identificar la distribución del virus de influenza B/Vic con doble delección en las posiciones 162-163 de la HA (V1A.1) en el país, de 2017 a 2019.

5.2 Específicos

- Detectar por RT-PCR en tiempo real la presencia de virus B/Vic pertenecientes al subclado V1A.1 en muestras de hisopados nasofaríngeos recibidas por el Laboratorio de Virus Respiratorios del InDRE en la Ciudad de México correspondientes a los años 2017, 2018 y 2019.
- Identificar diferencias entre los casos causados por virus V1A.1 y B/Vic sin la doble delección (V1A) con respecto al sexo, edad, entidad federativa, sintomatología, estacionalidad, evolución, estado del paciente y vacunación.
- Detectar posibles virus con triple delección de aa en HA en las posiciones 162-164, presumiblemente pertenecientes a los subclados V1A.2 y V1A.3, en las muestras a analizar.

VI. Materiales y métodos

6.1 Obtención de muestras

Se realizó la búsqueda de las muestras positivas a influenza B/Vic en las bases de datos del Laboratorio de Virus Respiratorios del InDRE, correspondientes a los años 2017, 2018 y 2019; posteriormente fueron recuperadas del banco de muestras y resguardadas a -80 °C hasta ser procesadas. Dichas muestras provinieron de los 32 Laboratorios estatales de Salud Pública (LESP) distribuidos en cada uno de los Estados de la República Mexicana y cinco laboratorios de apoyo a la vigilancia epidemiológica, de los cuales dos son institutos nacionales: el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), el Laboratorio Central de Epidemiología “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los trabajadores del Estado y el Hospital General de México, todos ellos ubicados en la Ciudad de México.

6.2 Búsqueda de los casos

Para obtener la información clínica de cada una de las muestras positivas a influenza B linaje Victoria seleccionadas, se realizó la búsqueda en la plataforma del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Respiratorias (SISVER) y se organizaron en una base de datos por cada uno de los años de estudio.

6.3 Extracción de ARN viral

El procedimiento se llevó a cabo en una cabina de seguridad clase II LABConco, modelo Logic con el kit de extracción de ácidos nucleicos QIAamp® Viral RNA Mini Kit, marca QIAGEN. Los reactivos se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La extracción se realizó por grupos no mayores a 20 muestras incluyendo el control de extracción; de cada una se tomó un volumen de 140 μ L en 560 μ L de solución de lisis (AV), se mezclaron en vortex y tras un spin de 20 segundos en microcentrífuga se le dejó incubando durante diez minutos; se adicionaron 560 μ L de alcohol etílico puro propiciando la precipitación del material genético, agitando y centrifugando como se realizó previamente e incubando por solo un minuto. En una columna de separación se dispensaron 630 μ L de la mezcla y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, se cambiaron los tubos de recolección y se hizo lo mismo con el resto del material lisado. Para la purificación se agregaron 500 μ L de la primera solución amortiguadora de lavado y se centrifugó con las condiciones antes mencionadas; se realizó un segundo lavado con 500 μ L de la segunda solución amortiguadora de lavado 2 y centrifugando dos veces, la primera a 14000 rpm por tres minutos y la segunda solo durante un minuto. La columna se traspasó a un microtubo estéril de 1.5 mL y se añadieron 60 μ L de buffer de elución y se pasó de nuevo por centrifuga a 8000 rpm por un minuto, finalmente se desechó la columna y el eluato se almacenó a 4 °C.

6.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Los eluatos de cada muestra fueron sometidos a tres ensayos de RT-PCR con el fin de confirmar el diagnóstico positivo para el virus de la influenza B, el linaje B/Vic y determinar la presencia o ausencia del gen que codifica la HA con doble delección de aa.

Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR tiempo real

Las mezclas de reacción se prepararon en el área del laboratorio asignada para “Master Mix” en una cabina de seguridad LABConco modelo 3970302 con el kit “Superscript® III Platinum One-Step qRT-PCR system” con los volúmenes indicados en los cuadros 2, 3 y 4.

Cuadro 2. Reactivos de la mezcla de reacción para detectar la presencia de material genético del virus de la influenza tipo B y de RNasa P por RT-PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (µL) (Por muestra y por sonda)
Agua grado biología molecular	5.5
Iniciador sentido	0.5
Iniciador antisentido	0.5
Sonda	0.5
Enzima	0.5
Regulador 2X	12.5
Volumen final (para una muestra)	20.0

Cuadro 3. Reactivos de la mezcla de reacción para detectar la presencia de material genético del virus de la influenza B/Vic y B/Yam por RT-PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (µL) (Por muestra)
Agua grado biología molecular	7.5
Iniciador sentido	0.5
Iniciador antisentido	0.5
Sonda B/Vic	0.5
Sonda B/Yam	0.5
Enzima	1
Regulador 2X	12.5
Volumen final (para una muestra)	23.0

Cuadro 4.- Reactivos de la mezcla de reacción para detectar la presencia de material genético del virus de la influenza B/Vic V1A.1 ($\Delta K_{162}N_{163}$) (VIC_KN del) y del virus de la influenza B/Vic (VIC_no del) por RT-PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (µL) (Por muestra)
Agua grado PCR	5.5
Combined Primer/Probe (VIC_KN del o VIC_no del)	1.5
Enzima	0.5
Regulador 2X	12.5
Volumen final (para una muestra)	20.0

Las sondas e iniciadores (combined primer/probe) para la detección del gen de la hemaglutinina ($\Delta K_{162}N_{163}$) (Figura 14) fueron proporcionados por la división de influenza del CDC.



Figura 14. Sondas e iniciadores para la detección del virus V1A.1 proporcionados por la división de influenza del CDC.

Las mezclas se cargaron en placas de 96 pocillos del modo en que se muestra en la imagen 15, 16 y 17, añadiendo 5 μ L de agua grado biología molecular en los pocillos requeridos como control negativo (2 μ L en la placa de linaje) y cubriendo estos con tapas ópticas para después envolver la placa en papel aluminio protegiéndola de la luz y se mantuvieron a 4 $^{\circ}$ C hasta su uso. Se elaboraron las hojas de registro LVIR-F-14 mostrando el orden en que se distribuyeron las mezclas de reacción y en que se colocaron posteriormente los extractos en las placas.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inf B	A	NTC											
RNasa P	B	NTC											
Inf B	C												
RNasa P	D												
Inf B	E												
RNasa P	F												
Inf B	G												
RNasa P	H												

Figura 15. Esquema de la carga de la mezcla de reacción para la detección del virus de la influenza B en una placa de 96 pocillos. NTC: Control negativo (Negative Control Template).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Vic/Yam	A	NTC											
Vic/Yam	B												
Vic/Yam	C												
Vic/Yam	D												
Vic/Yam	E												
Vic/Yam	F												
Vic/Yam	G												
Vic/Yam	H												

Figura 16. Esquema de la carga de la mezcla de reacción para la determinación de linaje en una placa de 96 pocillos. NTC: Control negativo (Negative Control Template).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIC_KN del	A	NTC											
VIC_no del	B	NTC											
VIC_KN del	C												
VIC_no del	D												
VIC_KN del	E												
VIC_no del	F												
VIC_KN del	G												
VIC_no del	H												

Figura 17. Esquema de la carga de la mezcla de reacción para detectar la presencia del gen que codifica la HA con doble delección de aa en una placa de 96 pocillos.

NTC: Control negativo (Negative Control Template).

Carga de los extractos de las muestras

Este proceso se realizó en el área del laboratorio designada como “templados” en una cabina de seguridad LABConco modelo 3970302.

Para la detección del virus de la influenza B se agregaron 5µL de eluato para cada sonda (Inf B y RNasa P), sin olvidar los controles de extracción.

Para la determinación del linaje se cargaron 2µL de eluato (una muestra por pocillo).

Para la detección del virus con el gen de HA con doble delección de aa se dispensaron 5µL de eluato para cada “prime/probe”.

Carga de controles positivos

Las placas se llevaron cubiertas con papel aluminio al área de controles positivos donde se colocaron en las placas dichos controles en los mismos volúmenes que los extractos. Los controles positivos para B/Vic V1A.1 ($\Delta K_{162}N_{163}$) (VIC_KN del) y del virus de la influenza B/Vic (VIC_no del) fueron proporcionados por la división de influenza del CDC.

Detección

Se trasladaron las placas envueltas en papel aluminio con los pocillos cubiertos por tapas ópticas al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real modelo Applied Biosystems 7500 Fast y se sacudieron con fuerza de arriba hacia abajo las veces necesarias para permitir que bajara el contenido retenido en las orillas de los pozos, evitando que se quedara el líquido en las tapas o paredes de los tubos de reacción.

Respecto a las condiciones de termociclado, para la detección del virus de la influenza B la retrotranscripción se dio durante 30 minutos a 50 °C, se elevó la temperatura a 95 °C por 2 minutos para activar el inhibidor Taq, seguido de 45 ciclos de amplificación a 95 °C por 15 segundos y 30 segundos a 55 °C en que se dará la

detección de la señal fluorescente. Se consideraron positivas aquellas muestras en que se detectó la sonda de Inf B y RNasa P, siempre y cuando también se haya detectado en el control positivo y no se hubiera amplificado nada en el control negativo y en los controles de extracción.

Para la determinación del linaje el termociclador se programó de la siguiente manera: 30 minutos a 50 °C para la retrotranscripción, 15 minutos a 95 °C para activar el inhibidor Taq, seguido de 45 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 segundos, 30 segundos a 54 °C y 10 segundos a 72 °C para la detección de señal. Se consideraron positivas al linaje B/Vic las muestras en que se detectó la sonda de Vic, o de ambos linajes, en tanto en el control negativo no hubiera amplificación alguna y se detectara la señal de ambas sondas en el control positivo.

Para la detección de la cadena de HA con doble delección de aa ($\Delta K_{162}N_{163}$), de acuerdo con el protocolo proporcionado de igual manera por el CDC el termociclador se programó con las siguientes especificaciones: retrotranscripción a 50 °C durante 30 minutos, 2 minutos a 95 °C para la inactivación del inhibidor Taq, seguido de 45 ciclos de amplificación a 95 °C por 15 segundos y detección de fluorescencia a 55 °C por 30 segundos. La detección de la sonda "VIC_KN del" indicó la presencia del virus Influenza B/Vic con delección en el gen de HA ($\Delta K_{162}N_{163}$) (V1A.1). Por otra parte, la detección de la sonda "VIC_no del" señaló que se trataba del virus de Influenza B/Vic sin delección en el gen de HA. Sin embargo, al no detectar la amplificación de ninguna señal se interpretó, de acuerdo al protocolo, como posible Influenza B/Vic con una triple delección en el gen HA ($\Delta K_{162}N_{163}D_{164}$) (V1A.2 y V1A.3).

6.5 Análisis de resultados

Los casos cuyas muestras fueron positivas al virus de influenza B, linaje B/Vic con el gen de la HA con doble delección (B/Vic V1A.1) se separaron de las positivas al virus de influenza B, linaje B/Vic sin el gen de la HA con doble delección (B/Vic). Ambos grupos fueron organizados por año, entidad federativa de origen de la

muestra, sexo y edad donde empleando t de *Student* y U de Mann-Whitney se compararon las medias entre ambos grupos; tipo de paciente, días de evolución, semana epidemiológica en que fue reportado y con o sin vacuna contra la influenza estacional y se compararon las proporciones entre ambos grupos.

Empleando razones de riesgo (RR) y de probabilidades (Ods Ratio (OR)) se buscó si existía relación entre padecer influenza por virus del subclado V1A.1 y el sexo del paciente, la evolución de los casos o el estar vacunado contra la influenza estacional; así como la probabilidad de padecer los síntomas reportados en casos de influenza al estar infectado por virus del subclado V1A.1 y que estos se compliquen más que los del grupo B/Vic. Se recurrió a la prueba de χ^2 para determinar cuáles de esas diferencias entre ambos grupos son significativas.

Se observó la estacionalidad y los grupos etarios más afectados por los virus B/Vic V1A.1 comparando su comportamiento con el de los B/Vic.

VII. Resultados

7.1 Número de muestras

En el año 2017 el InDRE recibió un total de 361 muestras positivas a influenza B, de las cuales 283 pertenecen al linaje B/Yam, 13 no cuentan con un linaje determinado y 65 al linaje B/Victoria, de estas, se utilizaron 60 para este estudio.

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real para la detección del gen de HA ($\Delta K_{162}N_{163}$) arrojaron que seis de las 60 muestras resultaron positivas al subclado V1A.1, es decir contaban con la doble deleción, mientras que solo una posiblemente poseía el gen con triple deleción ($\Delta K_{162}N_{163}D_{164}$) lo que le ubicaría en el subclado V1A.2 o V1A.3 (Figura 18).

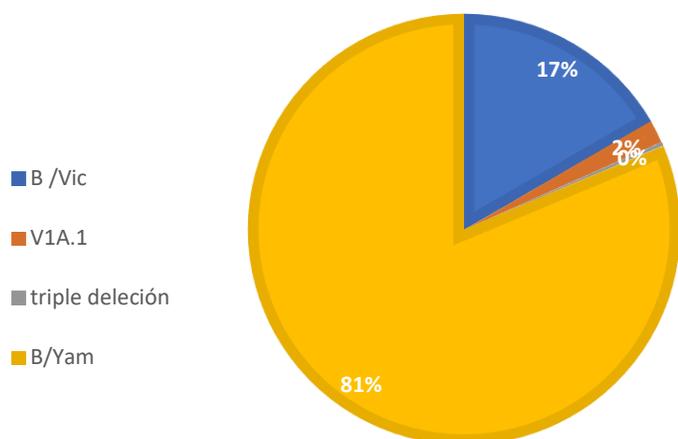


Figura 18. Distribución de las muestras de influenza B recibidas en 2017.

En el año 2018 (Figura 19), se recibieron 353 muestras diagnosticadas positivas a influenza B, 195 correspondían a linaje B/Yam y 150 a linaje B/Vic, de las cuales 140 se utilizaron para este análisis. Los resultados de la RT-PCR en tiempo real mostraron que 27 muestras pertenecían al subclado V1A.1 y dos, posiblemente, al V1A.2 o V1A.3.

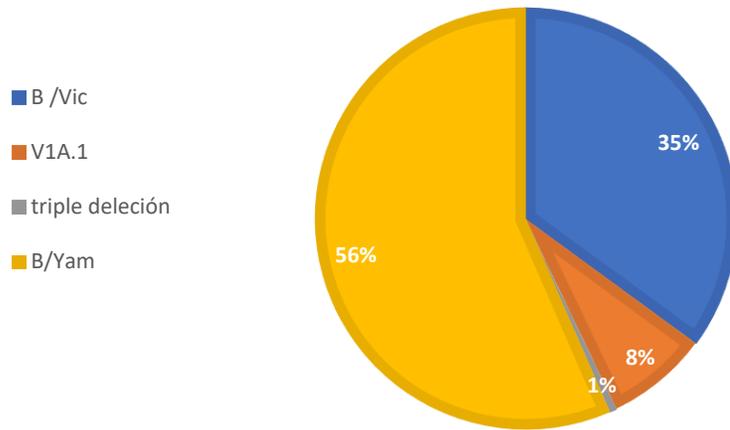


Figura 19. Distribución de las muestras de influenza B recibidas en 2018.

En 2019 (Figura 20) se recibió un total de 265 muestras positivas a influenza B, 169 del linaje B/Yam y 90 B/Vic, de las cuales únicamente se analizaron 37, 26 presentaron la doble deleción en HA y otra una posible triple deleción.

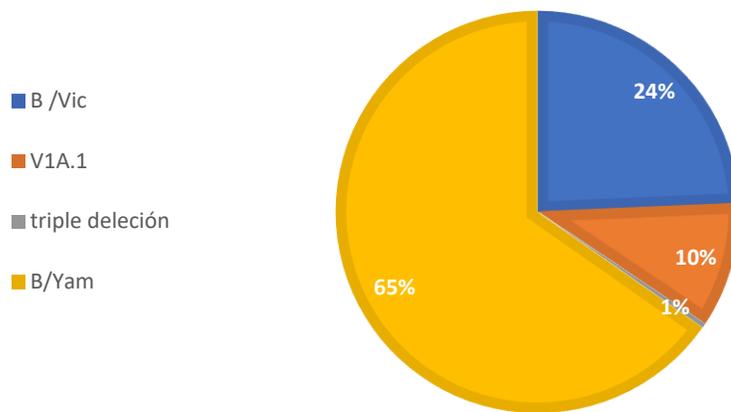


Figura 20. Distribución de las muestras de influenza B recibidas en 2019.

7.2 Distribución por sexo

De los 234 casos considerados 111 corresponden a pacientes masculinos y de estos 31 al grupo B/Vic V1A.1; de los pacientes femeninos (123 casos) 28 pertenecen al grupo B/Vic V1A.1 (Figura 21).

Aunque las razones de riesgo indican una probabilidad mayor a 1 de padecer influenza B por virus del subclado V1A.1 la prueba de χ^2 arrojó que este resultado no es significativo.

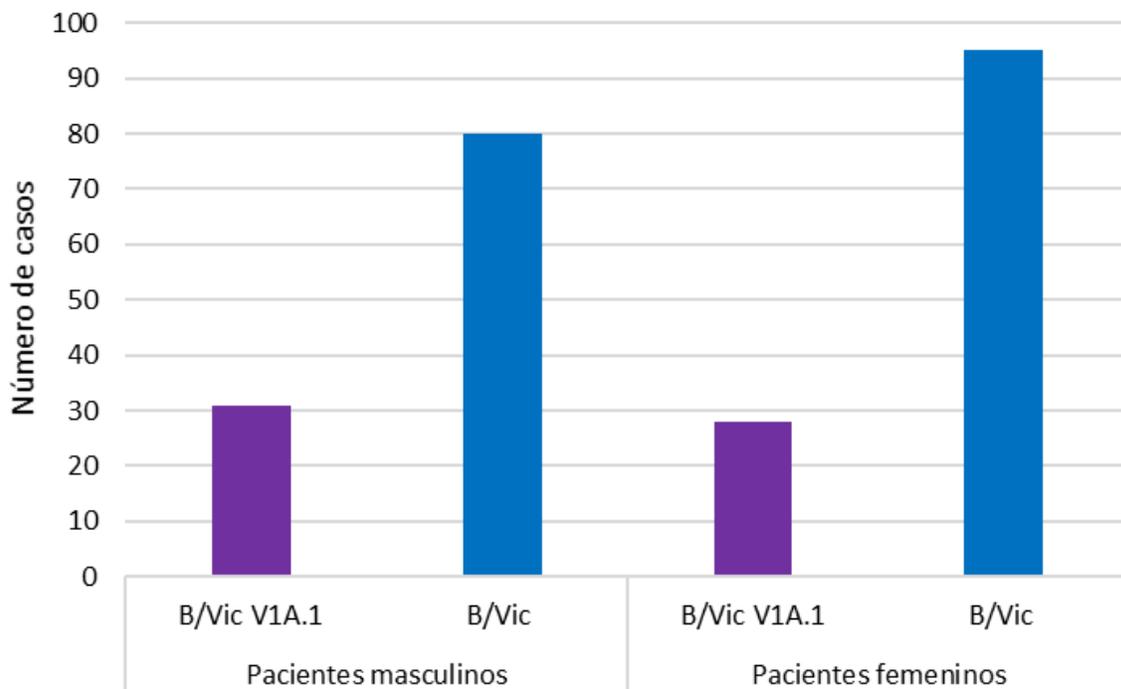


Figura 21. Distribución del total de casos (234) de acuerdo al sexo del paciente.

7.3 Distribución geográfica

La distribución geográfica de las 60 muestras procesadas en 2017 (Figura 22) es la siguiente: Aguascalientes (14), Baja California (1), Campeche (1), Chiapas (3), Coahuila (1), Hidalgo (2), Morelos (1), Nuevo León (6), Querétaro (6), Quintana Roo (1), Sonora (15), Tabasco (1), Tlaxcala (5) y Zacatecas (3). Cinco de los 6 casos confirmados como infección por virus del subclado V1A.1 se reportaron de Querétaro, de la misma localidad, otra del mismo virus se recibió de Aguascalientes.



Figura 22. Entidades de donde provienen las muestras recibidas por el InDRE en 2017. Azul: Casos de Influenza por virus B/Vic; violeta: Casos de influenza por virus del subclado V1A.1.

La distribución geográfica para las 150 muestras procesadas durante 2018 (Figura 23) corresponden a: Aguascalientes (6), Baja California (7), Chiapas (5), Ciudad de México (18), Coahuila (12), Colima (1), Durango (1), Guerrero (3), Hidalgo (5),

Jalisco (4), Estado de México (4), Michoacán (5), Morelos (6), Nuevo León (1), Puebla (3), Querétaro (5), Quintana Roo (3), San Luis Potosí (8), Sinaloa (3), Sonora (9), Tabasco (2), Tamaulipas (4), Tlaxcala (6), Veracruz (10), Yucatán (7) y Zacatecas (2). Los casos de infección por virus de influenza con doble delección se ubicaron en 10 estados, Baja California (6), Chiapas (2), Ciudad de México (8), Durango (1), Puebla (1), Quintana Roo (2), Sonora (3), Tlaxcala (1), Veracruz (3) y Yucatán (3) (Figura 22).



Figura 23. Entidades de donde provienen las muestras recibidas por el InDRE en 2018. Azul: Casos de Influenza por virus B/Vic; violeta: Casos de influenza por virus del subclado V1A.1.

En 2019 (Figura 24) las muestras analizadas provinieron de nueve entidades, de Ciudad de México (11), Coahuila (1), Guerrero (3), Hidalgo (10), Morelos (1), Puebla (2), Querétaro (2), San Luis Potosí (4) y Tlaxcala (4). De las 26 positivas al subclado

V1A.1, 10 son originarias de la CDMX, a la que le sigue Hidalgo con cuatro, Guerrero tres, Estado de México, Querétaro, Tlaxcala y San Luis Potosí dos cada uno, Puebla, Morelos y Coahuila una. Vale la pena recalcar que la Ciudad de México reportó una con triple delección.



Figura 24. Entidades de donde provienen las muestras recibidas por el InDRE en 2019. Azul: Casos de Influenza por virus B/Vic; violeta: Casos de influenza por virus del subclado V1A.1.

7.4 Distribución por edad

Para presentar los resultados de las muestras positivas a influenza B linaje Victoria sin deleción y con doble deleción los grupos de edad se distribuyeron en quinquenios partiendo de los cero años. Los casos por B/Vic sin deleción se acumulan de los 0 a 34 años, mientras que para las B/Vic con doble deleción esto se observa de los 0 a 14 años. En ambos grupos el número de casos disminuye en función de la edad.

Al comparar la distribución en porcentajes de los grupos etarios de casos por B/Vic y V1A.1 (Figura 25) se observan similares. Las medias de ambos se encuentran en 23 para los casos de infección por B/Vic y 20 en aquellos con V1A.1; por prueba t de *Student* y de U de Mann-Whitney se encontró que la diferencia no es estadísticamente significativa.

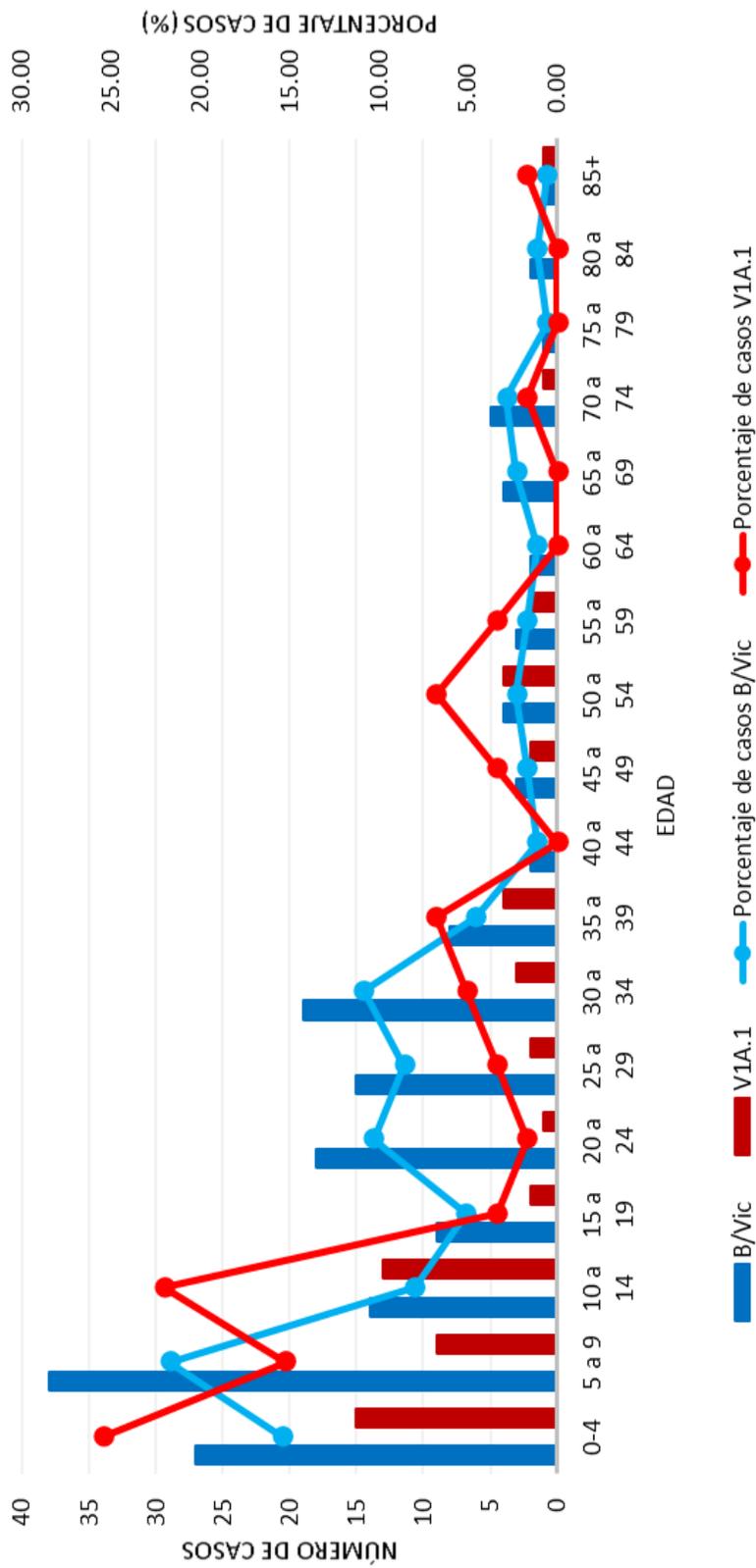


Figura 25. Distribución de los casos de infección por virus B/Vic y del subclado V1A.1 por grupos etarios.

7.5 Días de evolución

Los lineamientos para la vigilancia por laboratorio de virus respiratorios establecen que la fecha de toma de muestra en los casos sospechosos de influenza se realice en los primeros cinco días a partir de la fecha de inicio de síntomas (días de evolución en pacientes ambulatorios y hasta siete tratándose de hospitalizados).

En la figura 26 se muestra que no hay diferencia entre los días de evolución de los casos de infección por virus B/Vic y V1A.1, en ambos casos las muestras fueron tomadas dentro del tiempo establecido.

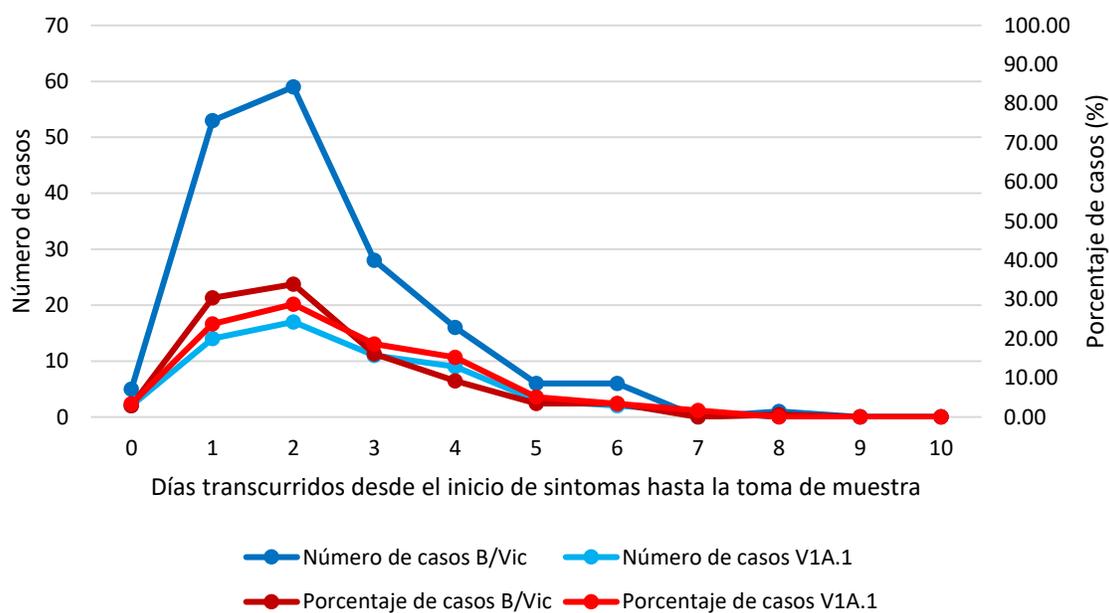


Figura 26. Días de evolución de los casos de infección por B/Vic y V1A.1.

7.6 Sintomatología

Los cálculos de las razones de riesgo (RR) y razón de probabilidades (en inglés, odds ratio (OR)) determinan la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo que ocurra en otro. En los Cuadros 5 a 7 se muestran las diferencias entre el total de pacientes con diagnóstico de infección por virus B/Vic y V1A.1 con respecto a los 18 síntomas más citados en la bibliografía y considerados en las bases de datos del InDRE y se encontró que es más probable que en una infección por el virus con doble delección se presentaran los síntomas, odinofagia, irritabilidad, cefalea, mialgia y rinorrea. También se realizaron los cálculos en función del sexo de los pacientes, de estas pruebas se obtuvo que entre los pacientes femeninos era más probable presentar irritabilidad y cianosis en un cuadro de infección por virus V1A.1 que por B/Vic mientras que en masculinos el riesgo de presentar odinofagia, irritabilidad, cefalea, mialgia, artralgia, rinorrea y conjuntivitis aumenta en una infección por virus del subclado V1A.1.

Cuadro 5. Valores de Razón de Riesgo (RR) y razón de probabilidades (OR) para cada síntoma en el total de pacientes con infección por virus V1A.1 (los valores resaltados, >1 indican un riesgo).

<i>Síntoma</i>	<i>Fiebre</i>	<i>Tos</i>	<i>Odinofagia</i>	<i>Disnea</i>	<i>Irritabilidad</i>	<i>Diarrea</i>	<i>Dolor torácico</i>	<i>Escalofríos</i>	<i>Cefalea</i>
<i>RR</i>	1.04	0.97	1.08	0.77	1.35	0.81	0.78	0.89	1.00
<i>OR</i>		0.57	1.24	0.62	1.74	0.79	0.65	0.71	1.01

<i>Síntoma</i>	<i>Mialgia</i>	<i>Artralgia</i>	<i>Ataque al estado general</i>	<i>Rinorrea</i>	<i>Polipnea</i>	<i>Vómito</i>	<i>Dolor de abdomen</i>	<i>Conjuntivitis</i>	<i>Cianosis</i>
<i>RR</i>	1.07	1.10	0.92	1.03	0.73	0.81	0.84	0.99	0.74
<i>OR</i>	1.26	1.23	0.64	1.17	0.64	0.77	0.79	0.98	0.73

Cuadro 6. Valores de Razón de Riesgo (RR) y razón de probabilidades (OR) para cada síntoma en pacientes femeninos con infección por virus V1A.1 (los valores resaltados, >1 indican un riesgo a presentarse).

Síntoma	Fiebre	Tos	Odinofagia	Disnea	Irritabilidad	Diarrea	Dolor torácico	Escalofríos	Cefalea
RR	1.02	0.95	0.88	0.78	1.49	0.48	0.73	0.84	0.91
OR		0.42	0.71	0.62	2.07	0.46	0.55	0.57	0.54

Síntoma	Mialgia	Artralgia	Ataque al estado general	Rinorrea	Polipnea	Vómito	Dolor de abdomen	Conjuntivitis	Cianosis
RR	0.94	0.86	0.85	0.83	0.90	0.67	0.75	0.69	2.26
OR	0.83	0.70	0.43	0.49	0.86	0.64	0.68	0.59	2.35

Cuadro 7. Valores de Razón de riesgo (RR) y razón de probabilidades (OR) para cada síntoma en pacientes masculinos con infección por virus V1A.1 (los valores resaltados, >1 indican un riesgo a presentarse).

Síntoma	Fiebre	Tos	Odinofagia	Disnea	Irritabilidad	Diarrea	Dolor torácico	Escalofríos	Cefalea
RR	1.09	0.98	1.35	0.76	1.21	0.86	0.88	0.96	1.11
OR		0.76	2.21	0.64	1.44	0.83	0.83	0.90	1.73

Síntoma	Mialgia	Artralgia	Ataque al estado general	Rinorrea	Polipnea	Vómito	Dolor de abdomen	Conjuntivitis	Cianosis
RR	1.21	1.35	0.99	1.22	0.57	0.86	0.95	1.29	0
OR	1.94	2.21	0.96	4.51	0.47	0.82	0.93	1.5	0

Para determinar si estas diferencias son estadísticamente significativas se realizó la prueba de χ^2 cuyos resultados se muestran en el Cuadro 8, donde al considerar el total de casos sin distinguir del sexo se presentó significancia entre ambas infecciones, la irritabilidad (Figura 27), se observa igual en el grupo de pacientes femeninos, presentándose con mayor frecuencia en casos de infección por V1A.1 (Figura 28). En contraste, entre los pacientes masculinos tres síntomas aparecen más frecuentemente en aquellos infectados por el virus B/Vic con doble delección, estos son la odinofagia, artralgia y rinorrea (Figura 29).

Cuadro 8. Valores de χ^2 para cada síntoma en el total de casos y por sexo, entre B/Vic y B/Vic V1A.1 (los valores resaltados son significativamente diferentes, considerando un valor de χ^2 crítico al 90 % igual a 2.70).

Síntoma/ casos	Fiebre	Tos	Odinofagia	Disnea	Irritabilidad	Diarrea	Dolor torácico	Escalofríos	Cefalea
Femeninos	0.59	0.88	0.57	1.22	2.85	0.51	1.79	1.45	1.08
Masculinos	2.80	0.09	3.12	1.05	0.74	0.10	0.15	0.058	1.00
Total	2.43	0.76	0.46	2.43	3.38	0,24	1.84	1.17	0.001

Síntoma/ casos	Mialgia	Artralgia	Ataque al estado general	Rinorrea	Polipnea	Vómito	Dolor de abdomen	Conjuntivitis	Cianosis
Femeninos	0.14	0.65	2.53	2.19	0.091	0.44	0.53	1.13	0.88
Masculinos	1.90	3.12	0.005	4.35	2.21	0.13	0.017	0.82	2.02
Total	0.49	0.45	1.35	0.17	1.63	0.39	0.42	0.003	0.15

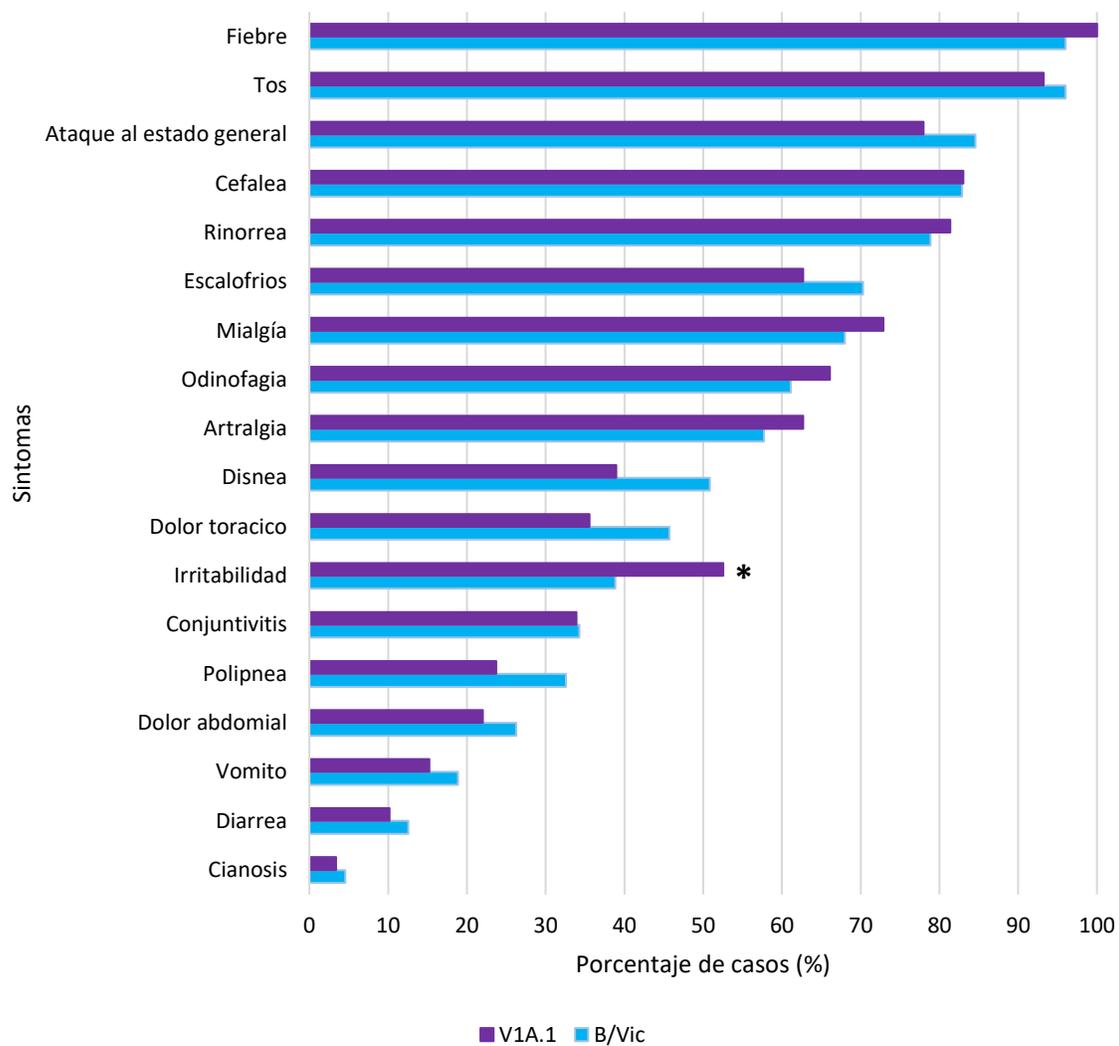


Figura 27. Sintomatología del total de casos

*= significativamente diferente ($p < 0.10$).

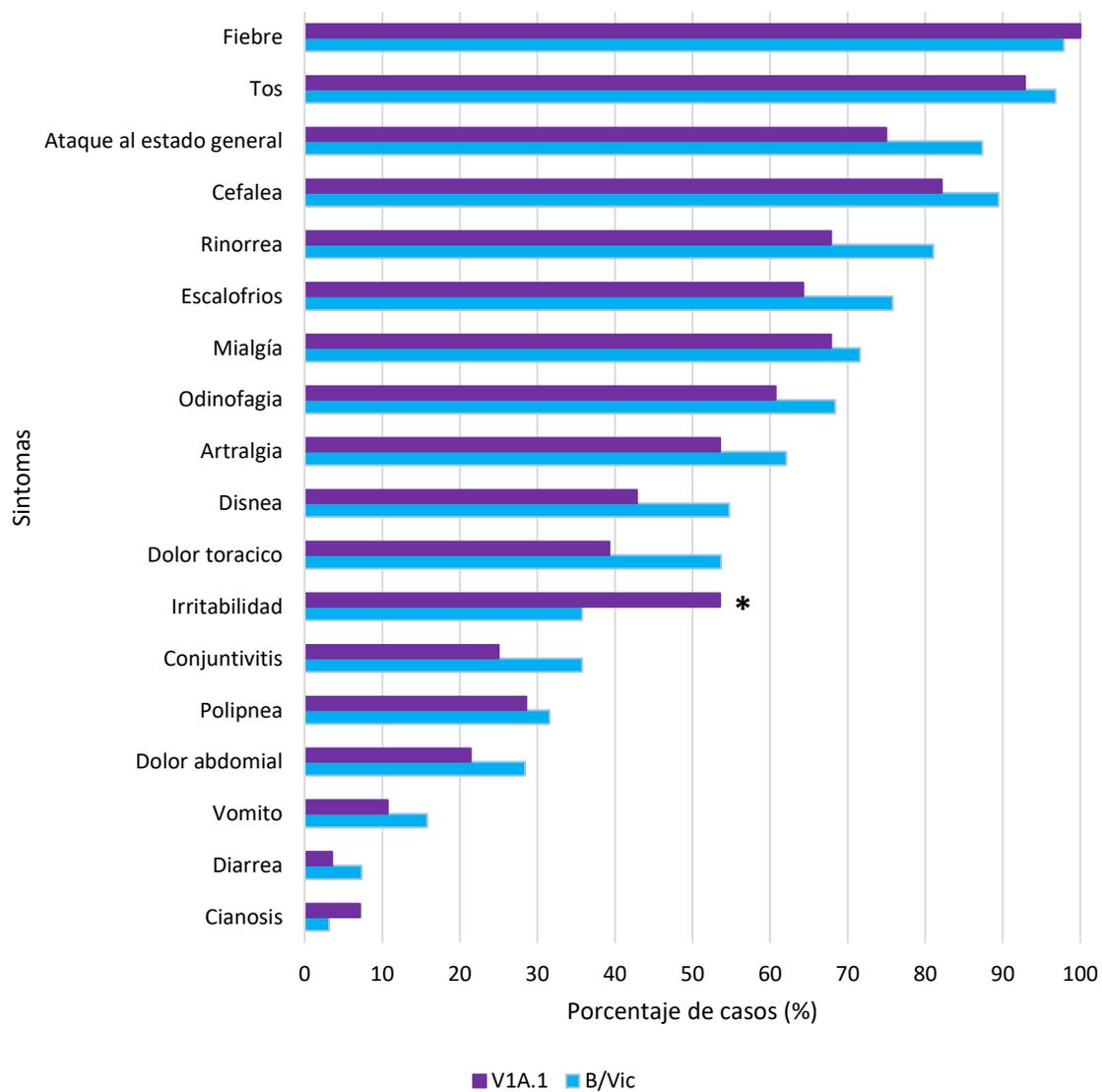


Figura 28. Sintomatología en el grupo de pacientes femeninos.

*= significativamente diferente ($p < 0.10$).

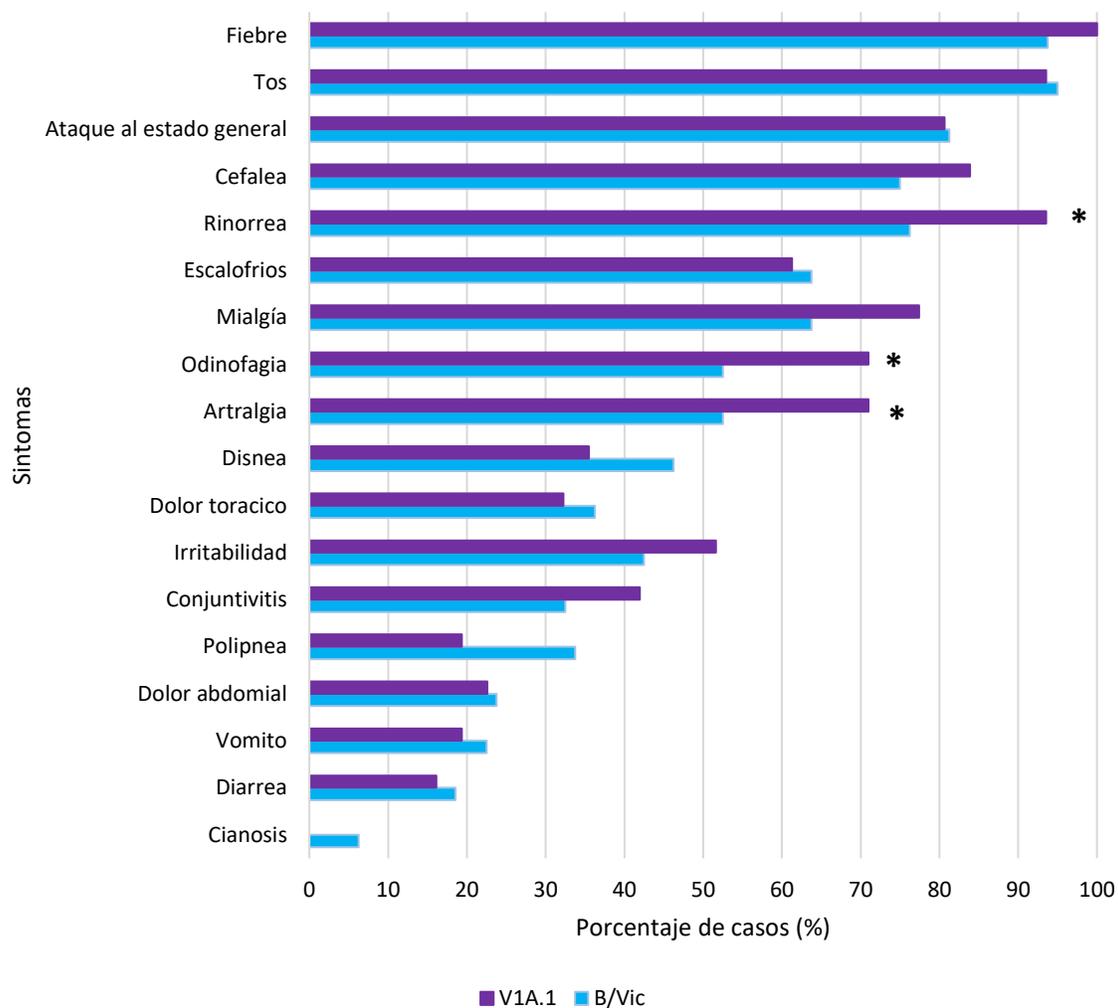


Figura 29. Sintomatología en el grupo de pacientes masculinos.

*= significativamente diferente ($p < 0.10$).

7.7 Estacionalidad

Tomando en cuenta la fecha de inicio de síntomas de cada uno de los casos, estos se distribuyeron en semanas epidemiológicas para observar su circulación a lo largo de los tres años.

En la Figura 30 se observa una marcada estacionalidad en la circulación de influenza B/Vic y del subclado V1A.1, para ambos los meses de mayor circulación fueron de octubre a mayo. El virus de influenza circula durante todo el año, pero la mayor parte se da en el otoño, invierno e inicios de la primavera, es por ello que vemos tanto a B/Vic como al subclado V1A.1 en menor circulación los meses de junio a septiembre (Figura 29). Los resultados muestran que el subclado V1A.1 presenta la misma estacionalidad que los virus de influenza B/Vic aunque siguen presentándose casos en los meses intertemporada.

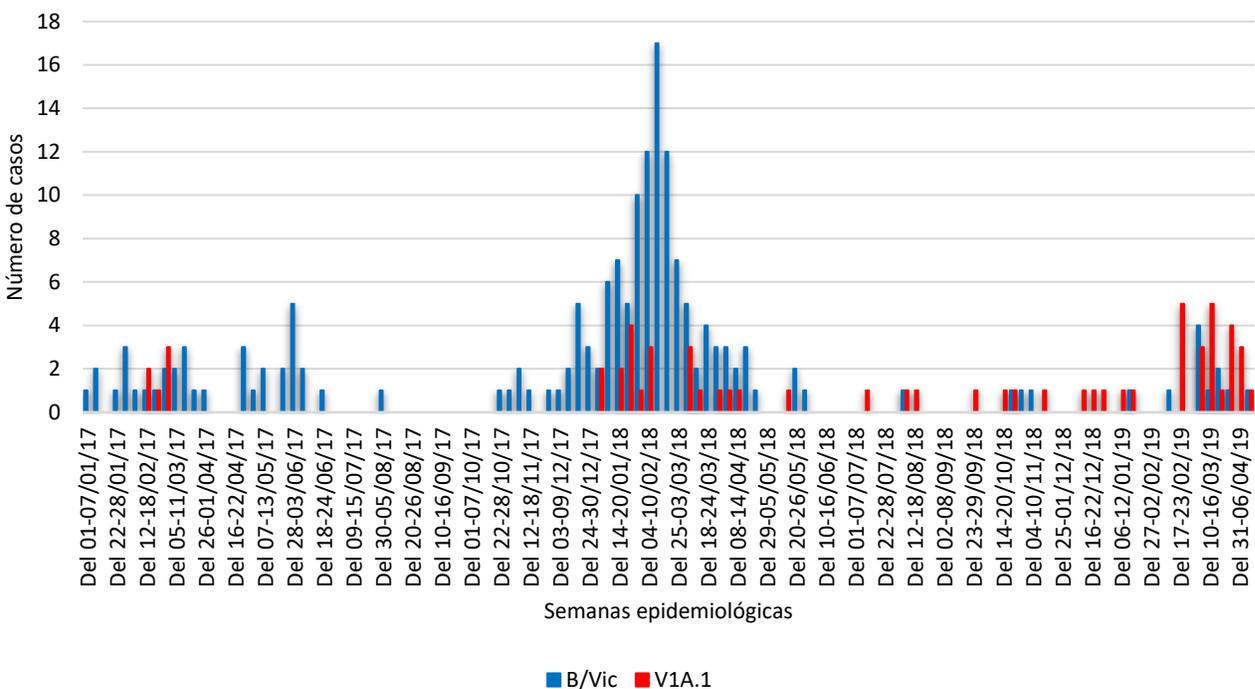


Figura 30. Estacionalidad de los virus B/Vic y V1A.1.

7.8 Clasificación del paciente

Existen dos definiciones operacionales establecidas para el diagnóstico inicial de los casos de influenza, Enfermedad tipo influenza (ETI): persona de cualquier edad que presente o refiera haber tenido fiebre de 38 °C o más y tos seca, con inicio en los últimos diez días; e infección respiratoria aguda grave (IRAG): persona de cualquier edad que presente o haya tenido fiebre igual o mayor a 38 °C, tos, dificultad al respirar, que haya empezado en los últimos diez días y requiera hospitalización. En cualquier caso, pueden estar acompañados de uno o más de los siguientes signos o síntomas: cefalea que en menores de cinco años se reemplaza por irritabilidad, rinorrea, coriza, artralgias, mialgias, postración, odinofagia, dolor torácico, dolor abdominal, congestión nasal y diarrea. En la base de datos de la plataforma del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad Respiratoria (SISVER), los pacientes ambulatorios son clasificados como ETI y los hospitalizados, IRAG, que también se segregan en función del estado del paciente en “altas”, “no graves”, “graves” y “defunción”.

Los resultados muestran que el 60.7 % de las muestras positivas a B/Vic son de pacientes hospitalizados mientras que el 39.3 % corresponde a ambulatorios. En el caso del subclado V1A.1 el 50.8 % corresponde a pacientes ambulatorios y el 49.2 % a hospitalizados. Los índices de correlación RR y OR comparando B/Vic contra V1A.1 arrojaron cifras superiores a uno, 1.23 y 1.59 respectivamente lo que significa que es más probable ser hospitalizado por infección de B/Vic que por V1A.1. Es importante mencionar que la vigilancia de influenza en México se realiza a través de un sistema de vigilancia centinela, el cual se encarga de recopilar datos de manera sistemática y rutinaria en un número limitado de puntos (475 Unidades de Salud Monitoras de Enfermedades Respiratorias (USMER)). Cada una se encarga de captar el 10 % de casos ambulatorios y el 100 % de los hospitalizados, muy probablemente a esto se deba que se encuentren un mayor número de pacientes hospitalizados (Figura 31).

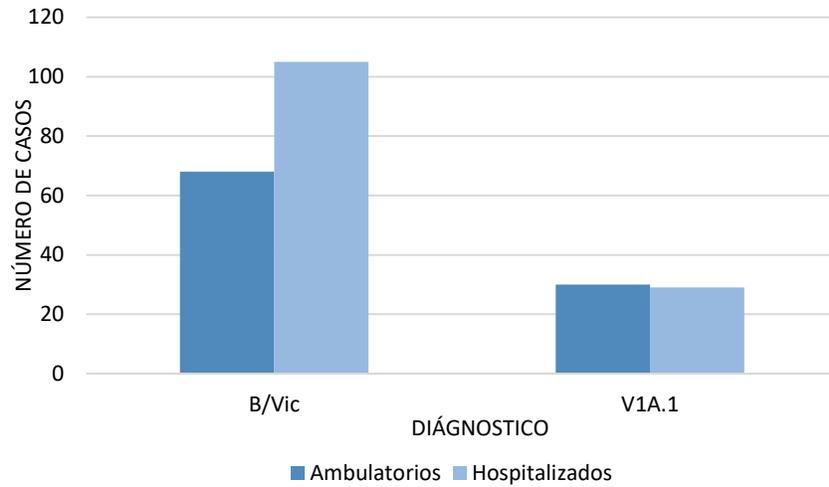


Figura 31. Distribución de B/Vic y V1A.1 de acuerdo a la clasificación del paciente considerando el total de las muestras.

Aquellos pertenecientes al grupo de hospitalizados se dividieron a su vez en la forma en que evolucionó el paciente. Los resultados muestran que la proporción de altas en pacientes con B/Vic es mayor en comparación con los pacientes con V1A.1. Las proporciones de casos graves y no graves es semejante mientras que en cuanto a defunciones no se reportó ninguna por parte de los casos positivos a V1A.1 (Figura 32).

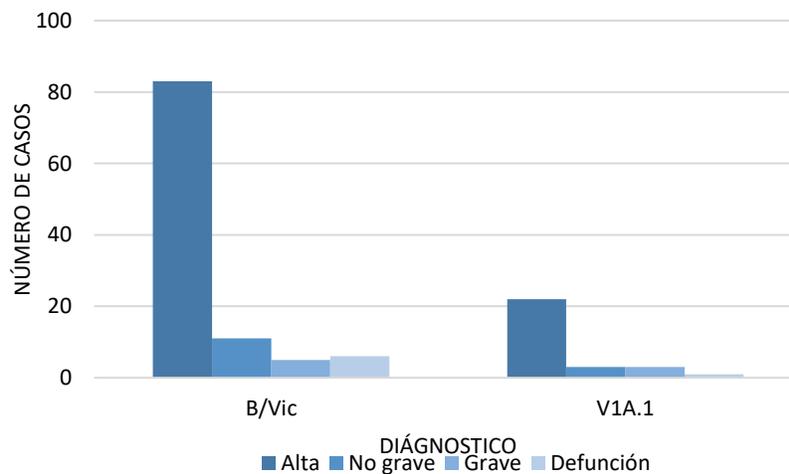


Figura 32. Distribución de B/Vic y V1A.1 de acuerdo a la subclasificación en pacientes hospitalizados.

7.9 Vacunación

Se analizaron los datos de vacunación de las muestras en estudio. La mayoría de los pacientes cuyas muestras se analizaron no recibieron la vacuna de influenza estacional, o no recordaban haberlo hecho, por tanto, se consideró como vacuna no recibida. La Figura 33 muestra que en los tres años revisados el número de casos de infección por el virus B/Vic en pacientes vacunados es bajo; no existen diferencias significativas entre las proporciones de pacientes vacunados y no vacunados en cada uno de los años. Las medidas de asociación (Cuadro 9) muestran que es más probable enfermarse por el subclado V1A.1 que por B/Vic aun habiendo contado con la vacuna estacional.

Cuadro 9. Medidas de asociación RR y OR del total de los casos, para presentar una infección por B/Vic o V1A.1 al contar con la vacuna contra influenza estacional.

<i>Virus/ Medidas de asociación</i>	<i>Inf B/Vic</i>	<i>Inf B/Vic V1A.1</i>
<i>RR</i>	0.71	1.41
<i>OR</i>	0.67	1.49

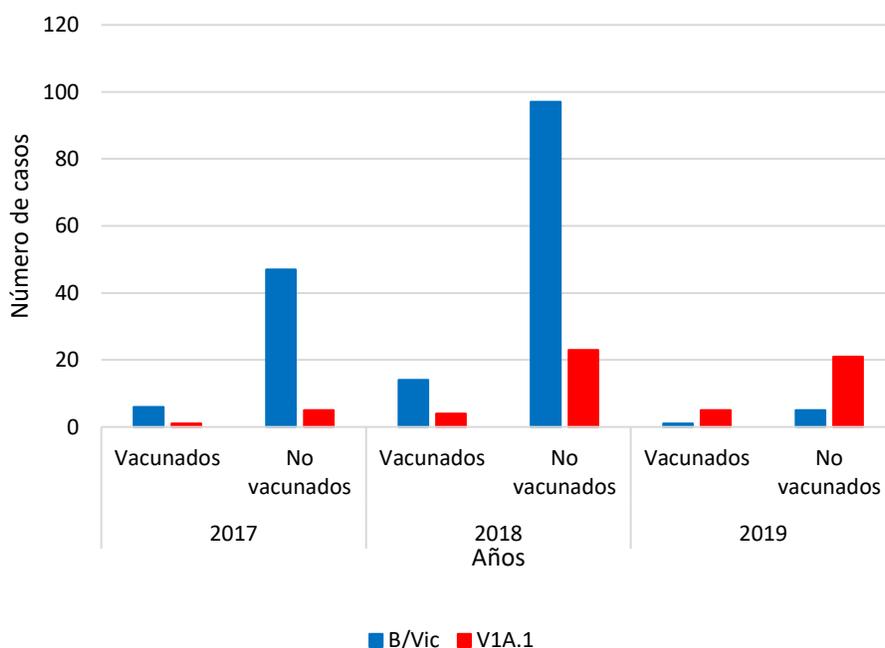


Figura 33. Proporción de casos con o sin antecedente de vacunación.

VIII. Discusión

8.1 Número de muestras y distribución geográfica

Cada uno de los laboratorios de la red de vigilancia epidemiológica está a cargo de realizar el diagnóstico de influenza por RT-PCR en tiempo real para identificar influenza A(H1N1) pdm09, A(H3N2), influenza B, influenza B linaje Victoria y Yamagata, y una vez realizado enviar las muestras positivas a influenza con un valor de Ct menor o igual a 32 al InDRE de acuerdo a los lineamientos establecidos para la vigilancia por laboratorio de virus respiratorios (InDRE, 2021).

Es debido a que los virus de la influenza tipo B circulan en menor proporción que los del tipo A que este estudio enfocado en el linaje Victoria cuenta con un número reducido de muestras.

De acuerdo a los datos recopilados del sistema de vigilancia, en 2017 el porcentaje general de positividad a influenza en el país fue de 26.2 % (influenza A 20.4 % e influenza B 5.8 %, la positividad al linaje Yamagata fue del 1.5 %, del linaje Victoria 0.4 % y el 3.9 % corresponde a influenza B sin linaje), en 2018 el porcentaje de positividad a influenza es del 22.9 % (influenza A 18.1 % e influenza B 4.8 %, la del linaje Yamagata 1.6 %, 1.0 % al linaje Victoria, y el 2.2 % corresponde a influenza B sin linaje), y durante 2019 el porcentaje de positividad para influenza fue del 23.3 % (influenza A 18.8 % e influenza B 4.5 %, al linaje Yamagata fue del 2.3 %, del linaje Victoria fue 1.5 %, y el 0.7 % corresponde a influenza B sin linaje), estas proporciones entre linajes de influenza B son semejantes a los encontrados en este trabajo donde en 2017 la proporción de los linajes detectados reveló que el 19 % de las muestras pertenecían al linaje Victoria, para 2018 lo fue el 44 % y en 2019 el 35 %, concordando en que el linaje Yamagata predominó en dichas temporadas. En el estudio de Balekar *et al.* (2019), encontraron que, en Latinoamérica, en 2013 la proporción entre linajes fue semejante revelando codominancia y en 2014 y 2015 predominó el linaje B/Yam, resultado que es semejante al encontrado en este trabajo. Los porcentajes de positividad hallados en México son parecidos a los de otros países en el hemisferio norte como Bangkok en donde entre 2009 y 2012 el 3 % de las muestras correspondía al tipo B (Prachayangprecha *et al.*, 2013). En 15

naciones de la región Asia-Pacífico la proporción de casos confirmados de influenza B de acuerdo con la literatura varía del 0 a 92 % (Jennings *et al.*, 2018).

En Latinoamérica entre 2010 y 2017 se reportaron 38,456 casos de influenza tipo B contra 182,813 del tipo A, de los primeros el número anual va de aproximadamente 4,500 hasta 7,000, representando el 11-26 % del total de casos, aunque en algunos países alcanzó el 43 % (Balekar *et al.*, 2019).

En otras regiones del hemisferio norte como Europa no existen datos claros respecto a la incidencia de ambos linajes, a la mayoría de las muestras positivas a influenza B no se les ha determinado linaje (Tafalla *et al.*, 2016).

Shu *et al.* (2020), tras analizar 77 muestras positivas a B/Vic determinaron que 27 de estas corresponden al subclado V1A.1 y otras 20 presentaban el gen de HA con la triple delección de aa.

Para 2018, en Sudáfrica todos los virus de las muestras analizadas de casos positivos a influenza B/Vic corresponden al linaje V1A.1, fenómeno que en las temporadas anteriores no había sido observado, atribuido a mayor transmisibilidad de este en comparación a los virus V1A sin la doble delección de aa en HA (Hellferscee, 2021).

8.2 Grupos etarios

El mayor número de casos de B/Vic se presenta en el grupo que va de los cero a 14 años de edad y entre los 20 y 34 años, mientras que respecto al subclado V1A.1 el mayor número va de los 0 a 14 años, esto concuerda con los resultados obtenidos por Yang *et al.* (2018), donde indican que los niños entre 5 y 15 años de edad son los más afectados por ambos linajes del virus de influenza tipo B, esto atribuible a una mayor transmisibilidad entre los más jóvenes. También se observa en Bangkok en 2009 y 2012 en que la edad objetivo fue la escolar afectando en mayor proporción a la población entre los 5 y 24 años, la edad media de los casos analizados fue de

19 años (Prachayangprecha *et al.*, 2013), similar a lo obtenido aquí, la media para los casos de infección por B/Vic es de 23 años mientras que en el subclado V1A.1 es de 20. Respecto a los casos por V1A.1, es semejante a un brote intenso en Louisiana durante la temporada 2019-2020 en que se reportaron 1,268 casos pediátricos de influenza B confirmados por laboratorio, los cuales eran causados por virus pertenecientes a las nuevas variantes con deleciones en el gen de HA; la mayoría de los pacientes tenían menos de 18 años y la edad media era de 6 años (Owusu *et al.*, 2020).

Como ya se mencionó, entre los 20 y 34 años hay un número considerable de casos B/Vic, concordante con Nucamendi (2014) que reportó que el grupo etario más afectado en la temporada 2012-2013 fue comprendido entre los 25 y 29 años, parecido a lo hallado en 2011, en Bangkok, cuando la mayor proporción de casos tuvo lugar entre la población en edad laboral (25 a 49 años) (Prachayangprecha *et al.*, 2013).

En otras regiones del hemisferio norte como lo es en algunos países europeos la mayoría de los estudios se enfocan y reportan la proporción de circulación de los linajes del virus de influenza B en la población pediátrica, pero datos de su distribución en toda la población por grupos etarios son escasos (Tafalla *et al.*, 2016). En la región Asia-Pacífico la distribución de estos virus es mayor en niños entre uno y diez años, se reporta además que estos casos son más severos que los causados por el virus tipo A en la misma población (Jennings *et al.*, 2018).

Una de las razones por la cuales se encontraron pocos casos en los mayores a 60 años es que en esos tiempos la población en los extremos de la vida, es decir menores de un año y mayores de 60 son el blanco en los programas de vacunación (Ruiz-Matus *et al.*, 2017).

8.3 Evolución de los casos

De acuerdo con los lineamientos para la vigilancia por laboratorio de virus respiratorios (2021) las muestras consideradas para el diagnóstico por laboratorio pueden ser exudado faríngeo, nasofaríngeo y lavado bronquio alveolar, las cuales deben tomarse dentro de los primeros cinco días de iniciados los síntomas, de preferencia en la primeras 72 h, esto en pacientes ambulatorios con el fin de garantizar la mayor carga viral; en el caso de pacientes hospitalizados el intervalo se extiende hasta siete días.

Indicaciones similares son consideradas en otros trabajos por ejemplo el de Gherasim *et al.* (2017), en cuyo estudio restringen el análisis a pacientes muestreados tres o menos días después de iniciar el cuadro sintomático. Al hacer esto se comprende que la mayoría de los casos se encuentran en la fase aguda de la infección, dentro del límite establecido y por tanto además de contar con suficiente carga viral otros datos como su evolución y sintomatología que es valorada por el médico tratante cuentan con mayor confiabilidad.

8.4 Sintomatología

Los síntomas cardinales que indican una enfermedad causada por el virus de la influenza son tres: fiebre igual o mayor a 38 °C, tos y cefalea. Acompañados por uno o más de los siguientes: rinorrea, escalofríos, mialgia, odinofagia, dolor torácico y abdominal y ataque al estado general, esto hablando de pacientes adultos, al tratarse de niños menores de cinco años la irritabilidad reemplaza a la cefalea como síntoma cardinal y en mayores de 65 no se considera la fiebre (Forleo-Neto *et al.*, 2003; lineamientos para la vigilancia por laboratorio de virus respiratorios, 2021), con base en esto al considerar los resultados expresados en la Figura 27 hace sentido el aumento significativo en la frecuencia de la irritabilidad en casos de infección por V1A.1 siendo que la mayoría de los casos estudiados se encuentran en edad pediátrica. Owusu *et al.* (2020), reportaron que el cuadro sintomático de los

pacientes pediátricos infectados por las variantes con deleciones en HA es común, típico de la influenza B, el 95 % tuvo fiebre, 68 % tos y 61 % escurrimiento nasal.

La fiebre alta típicamente alcanza su pico en las primeras 72 h, de manera similar la tos empeora al tercer o cuarto día, estos dos en adultos tienen un valor predictivo positivo del 79%. En niños es común la presencia de síntomas como vómito, dolor abdominal y diarrea (Noda *et al.*, 2010). Sin embargo, de acuerdo con Acosta *et al.* (2009), no se identifican síntomas que permitan hacer más probable el diagnóstico entre una y otra infección, además de que existen amplios rangos de frecuencia para algunos síntomas. Cabe señalar que las obtenidas en este trabajo son semejantes a los intervalos que señalan en casos de influenza estacional.

Las frecuencias de algunos síntomas se ven aumentadas en los casos de infección por virus del subclado V1A.1, irritabilidad en pacientes femeninos y rinorrea, odinofagia y artralgia en los masculinos, esta diferencia podría radicar en el dimorfismo sexual del sistema inmune ya que el género es un factor importante que regula esa respuesta al mismo antígeno con base a los niveles de esteroides sexuales pues mientras en las mujeres hay elevaciones cíclicas de estrógenos y progesterona y bajos niveles de andrógeno, en los hombres ocurre lo contrario (de León-Nava y Morales-Montor, 2006).

Esta diferencia se debe a que los dos cromosomas X les confieren una respuesta inmune innata y adaptativa más fuerte ante infecciones virales; el estrógeno y progesterona producen una respuesta antiinflamatoria reduciendo el número y actividad de los neutrófilos y células NK, aumenta el número de inmunoglobulinas y exhiben una expresión 10 veces mayor de toll-like-receptors (TLR) (Accinelli y León-Abarca, 2021; de Alarcón y Espinoza, 2016). Los andrógenos (testosterona, androsterona y androstenediona), en contraste, aplican un efecto antagónico a la progesterona (inmunosupresor), disminuye la concentración de células T que son la respuesta a la invasión de bacterias, virus, parásitos y hongos, aumenta la producción de IL-1 β e IL-12 e inhibe la de IL-1, IL-6 y TNF- α (de León-Nava y Morales-Montor, 2006; de Alarcón y Espinoza, 2016).

De acuerdo con Godínez-Aguilar (2009), este dimorfismo sexual inmunitario explica por qué los individuos femeninos son menos susceptibles a la mayoría de las infecciones estudiadas y por tanto la razón de que la mortalidad por enfermedades infecciosas y parasitarias sea mayor en hombres, hasta tres veces más en edades de los 40 a 50 años.

8.5 Estacionalidad

A pesar del reducido número de muestras se observa el comportamiento normal de los casos a lo largo de la temporada de influenza, encontramos un pico que va de octubre de 2017 y culmina en mayo de 2018 que concuerda con lo reportado por los lineamientos para la vigilancia por laboratorio de virus respiratorios (2021) que precisamente señalan estos meses como el inicio y final de la temporada de influenza. De acuerdo con Xu *et al.*, (2020), en la literatura se encuentra el consenso de que esta temporalidad es más clara en países del hemisferio norte con clima templado, México es uno de ellos. El pico máximo de la temporada se ubica en enero y febrero correspondiente a la circulación en el hemisferio norte (Durand *et al.*, 2015; Córdova-Villalobos *et al.*, 2017). Incluso los casos de infección por los virus del subclado V1A.1 parecen adecuarse a este modelo.

Los linajes de los virus de influenza B muestran un comportamiento bianual en su predominancia (Laurie *et al.*, 2018), ello explicaría la ausencia de un aumento de casos de influenza B/Vic en la temporada 2018-2019. Sin embargo, entre julio de 2018 y enero de 2019 se detectaron casos de infección por el subclado V1A.1, lo cual no es raro pues en verano se dan brotes que no suelen durar demasiado (Mont, 2009), como ocurrió en Louisiana en la temporada 2019-2020 en que se dio un severo aumento de casos pediátricos entre mayo y octubre (Owusu *et al.* 2020).

En México la mayoría de los casos reportados tuvieron lugar en la región península al suroeste del país, cuya temporalidad difiere del resto del país debido a su ubicación geográfica más próxima a los trópicos y al ecuador en donde los patrones

de circulación para la influenza en general no son claros (Xu *et al.*, 2020), además coincidiría parcialmente con el patrón de circulación del hemisferio sur en donde la temporada invernal tiene lugar entre julio y agosto (Córdova-Villalobos *et al.*, 2017). La presencia de estos casos en mayor proporción que los de B/Vic podría deberse por tanto a las condiciones ambientales.

8.6 Tipo de paciente

La mayoría de pacientes con infección por B/Vic requirieron de hospitalización, mientras que en los afectados por virus del subclado V1A.1 la proporción es similar entre hospitalizados y ambulatorios, parecido al comparar los casos de hospitalización entre linajes B/Vic y B/Yam donde de acuerdo con Jennings *et al.* (2018), con base en recientes estudios sugieren que la tasa de hospitalización en niños es mayor en casos de B/Vic que de B/Yam.

Considerando las medidas de asociación entre presentar una y otra infección y el ser un caso hospitalizado puede decirse que es más probable que un caso se complique al grado de ser internado si la infección es causada por el virus de influenza B/Vic.

Con respecto a las edades, cerca de la mitad de los casos que padecieron infección por influenza B/Vic que fueron dados de alta por mejoría se encontraban entre los primeros 15 años de vida mientras que en los infectados por el subclado V1A.1 este intervalo representó tres cuartas partes de estos casos, la media de edad para el primero fue de 24 mientras que en el segundo, 16, sin embargo tanto por test de U de Mann-Whitney como por análisis t-student no se encontró diferencia significativa al considerar un intervalo de confianza del 90 %. En otros países B/Vic parece afectar más a la mediana edad (Palekar *et al.*, 2019).

Coincidiendo con Tafalla *et al.*, (2016), no se encontró suficiente información asociada a la dinámica del virus de influenza B y el estado de los pacientes que padecen la enfermedad.

8.7 Vacunación

El hecho de que la proporción de casos vacunados sea menor en comparación con los no vacunados en ambas infecciones puede significar que las vacunas estacionales de las temporadas 2016-2017, 2017-2018 y 2018-2019 que contenían virus B/Brisbane/60/2008 en las primeras dos y B/Colorado/06/2017 en la última, ambos pertenecientes al linaje Victoria (Grohskopf *et al.*, 2016; CDC, 2017; Grohskopf *et al.*, 2018), son efectivas contra ambas infecciones ya que los virus contenidos en la vacuna de acuerdo con reportes del CDC (2017, 2018, 2019) presentaban la doble delección de aa en las posiciones 162-163 del gen de HA y aun cuando pudieran presentarse discordancias con la vacuna de las temporadas podría estar relacionada en realidad a una inmadurez o inmunosenescencia y es que niños y ancianos no responden de una forma apropiada a la vacuna contra influenza, o no como ocurre entre los individuos pertenecientes a la mediana edad, de hecho, entre las edades de 6 meses a nueve años es recomendable que reciban una doble dosis, al menos la primera vez.

La proporción de casos no vacunados contra los vacunados considerados en este trabajo es similar a lo encontrado por Ruiz-Matus *et al.* (2017), donde el 77 % del total de casos analizados no presentaban antecedentes de vacunación contra influenza.

El hecho de la falta de antecedente de vacunación es alarmante en la defensa contra la enfermedad y puede deberse a diferentes causas que van desde el desabasto hasta los grupos antivacunas (Córdova-Villalobos *et al.*, 2017). Sin embargo, un mayor conocimiento en la población podría disminuir el temor a la

enfermedad lo que si bien refuerza las medidas de prevención puede orillar a la gente a no sentir la necesidad de contar con la vacuna estacional (Xu y Peng, 2015).

IX. Conclusión

- Desde 2017 el InDRE ha recibido muestras positivas al subclado V1A.1. De las 237 muestras analizadas positivas a influenza B linaje Victoria, 56 fueron positivas a presentar el gen de HA con doble delección.
- La información obtenida de los casos clínicos es apropiada pues se reportaron dentro de los primeros cinco días de iniciados los síntomas.
- La mayoría de casos por V1A.1 se encuentran entre los 0 y 14 años de edad.
- El cuadro sintomático, en los pacientes masculinos, causado por los virus del subclado V1A.1 es más severo que el causado por virus B/Vic.
- El comportamiento de los casos de influenza por virus B/Vic V1A.1 a lo largo de las temporadas es semejante al de los virus B/Vic. Continuaron dándose casos entre las temporadas 2017-2018 y 2018-2019.
- Los casos causados por virus B/Vic sin doble delección están más propensos a complicarse y requerir hospitalización.
- Tres muestras fueron sospechosas de pertenecer a los subclados V1A.2 y V1A.3.

X. Referencias

- Accinelli R. y León-Abarca JA. (2021). Menor frecuencia y letalidad en mujeres y en la altura por covid-19: dos caras de una misma moneda. *Arch. Bronconeumol.* 57 (s2): 70-72.
- Acosta O., Guerrero C., Cortés J. (2009). Aspectos básicos, clínicos y epidemiológicos de la influenza. *Rev. Fac. Med.* 57 (2): 149-177.
- Astrahan P. y Arkin I. (2011). Resistance characteristics of influenza to amino-adamantyls. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1808: 547-553.
- Baehr F. y Mackenney J. (2014). Aspectos clínicos de la influenza. *Rev. Med. Clin. Condes.* 25 (3): 406-411.
- Baker D. y Agard D. (1994). Influenza hemagglutinin: kinetic control of protein function. *Structure.* 2 (10): 907-910.
- Batallanos A. (2009). Características estructurales y funcionales de la nueva influenza A H1N1. *Scientifica.* 7 (1): 37-41.
- Banerjee D., Kanwar N., Hassan F., Essmyer C., Selvarangan R. (2018). Comparison of six simple-to-answer influenza A/B and respiratory specimens from children. *J. Clin. Microbiol.* 56 (11): 1-10 e00930-18.
- Bouvier N. y Palese P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine NIH Public Access.* 26 (suppl 4): D49-D53.
- Carrada T. (2010). Influenza: Avances recientes en virología molecular y prevención de la enfermedad. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 57 (2): 59-93.
- Caini S., Kuiznierz G., Vera V., Wangchuk S., Thapa B., de Paula Junior FJ., Ferrera WA., Njovom R., Fasce RA., Bustos P., Feng L., Peng Z., Lara J., Bruno A., de Mora D., Barahona MJ., Pebody R., Zambori M., Higueros R., Rivera R., Korashi H., Castrucci MR., Bella A., Kandjo HA., Daouda C., Makusheva A., Bessonova O., Chaves S., Emukule GO., Heraud JM., Razanajatovo NH., Barakat A., Falaki FE., Meijer A., Donker GA., Huang QS., Wood T., Balmaseda A., Palekar R., Arévalo

BM., Rodriguez AP., Guiomar R., Lee VJM., Ang LW., Cohen C., Treurnicht F., Miyonenko A., Holubka O., Bresee J., Brammer L., Le MTQ., Hoang PVM., Guerche-Séblain CE., Paget J., The global influenza B study team (2019). The epidemiological signatura of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages inthe 21st century. *PLoS ONE*. 14 (9): e0222381. 1-17.

CDC. (2017). *Reporte de temporada 2016-2017*. División de Influenza.

CDC. (2018). *Reporte de temporada 2017-2018*. División de Influenza.

CDC. (2019). *Reporte de temporada 2018-2019*. División de Influenza.

CNETS. (2015). *Prevención, diagnóstico y tratamiento de la influenza estacional*. Secretaria de Salud. P. 57.

Córdova-Villalobos J., Macías A., Hernández-Ávila M., Domínguez-Cherit G., Lopez-Gatell H., Alpuche-Aranda C., Ponce de León-Rosales S. (2017). The 2009 Pandemic in Mexico: Experience and lessons regarding national preparedness policies for seasonal and epidemic influenza. *Gac. Med. Mex.* 153: 93-101.

Couch RB. (1996). Orthomyxoviruses. En: Baron S. editor. *J. Med. Microbiol.* Cuarta edición. University of Texas. Galveston, Texas.

Daniels R., Gregory V., Ermetal B., Rattigan A. y Mc Cauley J. (2017). European centre for disease prevention and control influenza virus characterization. *Summary Europe*. November 2017. Stockholm: ECDC; 2017.

De Alarcón B. y Espinoza R. (2016). El sistema inmune y el sexo. *MOLEQLA*. 21:28-31.

De León-Nava MA., Morales-Montor J. (2006). Dimorfismo sexual inmunitario. *Rev. Invest. Clin.* 58 (2): 161-169.

Dou D., Revol R., Ostbye H., Wang H. y Daniels R. (2018). Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front. Immunol.* 9: 1581.

Durand L., Cheng P., Palekar R., Clara W., Jara J., Cerpa M., Omeri N., Ropero-Alvarez A., Barbosa J., Lara J., Acosta B., Bruno A., Calderon C., Castillo L., Matute

M., Jackson-Betty S., Mung K., Diaz-Quiñonez J., Lopez-Martinez I., Balmaceda A., Morneo B., Vazquez C., Gutierrez V., Garten R., Widdowson MA., Azziz-Baumgartner E. (2015). Timing of influenza epidemics and Vaccines in the American tropics, 2002-2008, 2011-2014. *Influenza and Other respiratory viruses*. 10 (3): 170-175.

Dyer R. y Eller M. (2018). Dynamics of hemagglutinin-mediated membrane fusión. *PNAS*. 115 (35): 8655-8657.

Fang QQ., Huang WJ., Li XY., Cheng YH., Tan MJ., Liu J., Wei HJ., Meng Y., Wang DY. (2020). Effectiveness of farpiravir (T-705) against wild-type and oseltamivir-resistant influenza B virus in mice. *Virology*. 545: 1-9.

Farrukee R., Zarebski A., McCaw J., Bloom J., Reading P., Hurt A. (2018). Characterization of influenza B virus variants with reduced neuraminidase inhibitor susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62 (11): 1-12 e01081-18.

Flores-Munguía M., Vázquez-Moreno L. y Ramos-Clamont G. (2007). Glicobiología del virus de la influenza A. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49 (3-4): 74-87.

Forleo-Neto E., Halker E., Jorge V., Paiva T., Toniolo-Neto J. (2003). Influenza. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (2): 267-274.

Franco-Paredes C., Rodríguez-Morales AJ. y Santos Preciado JI. (2006). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la influenza. *CIMEL*. 11 (1): 27-34.

Fulton B., Sun W., Heaton N., Palese P. (2018). The influenza B virus Hemagglutinin head domain is less tolerant to transposon mutagenesis than that of the influenza A virus. *J. Virol.* 92 (16): 1-13 e00754-18.

García-García J. y Ramos C. (2006). La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud pública de México*. 48 (3): 244-267.

Gherasim A., Martínez-Baz I., Castilla J., Pozo F., Larrauri A., the cycEVA working group. (2017). Effect of previous and current vaccination against influenza A (H1N1) pdm09, A (H3N2), and B during the post-pandemic period 2010-2016 in Spain. *PLoS ONE*. 12 (6): 1-16.

Godínez-Aguilar R. (2009). *Dimorfismo sexual de células linfoides masculinas y femeninas para conocer las bases en la respuesta inmune y en las enfermedades autoinmunes*. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. P. 41.

Grohskopf L., Sokolow L., Broder K., Olsen S., Karron R., Jernigan D., Bresee J. (2016). Prevention and control of seasonal influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States, 2016-17 influenza season. *MMWR Recomm. Rep.* 65 (5): 1-52.

Grohskopf L., Sokolow L., Broder K., Walter E., Bresee J., Fry A., Jernigan D. (2017). Prevention and control of seasonal influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States, 2017-18 influenza season. *MMWR Recomm. Rep.* 66 (2): 1-22.

Grohskopf L., Sokolow L., Broder K., Walter E., Fry A., Jernigan D. (2018). Prevention and control of seasonal influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States, 2018-19 influenza season. *MMWR Recomm. Rep.* 67 (3): 1-22.

Hause B., Collin E., Llu R., Huang B., Sheng Z., Lu W., Wang D., Nelson E. y Li F. (2014). Characterization of a novel influenza virus in Cattle and swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBIO.* 5 (2): 1-10.

Hellferscee O., Treurnicht F., Gaelejew L., Moerdyk A., Reubenson G., McMorrow M., Tempia S., McAnerney J., Walaza S., Wolter N., von Gottberg A., y Cohen C. (2021). Detection of Victoria lineage influenza B viruses with K162 and N163 deletions in the hemagglutinin gene, South Africa, 2018. *Health Sci. Rep.* 4 (3): e367.

Honemann M., Martin D., Pietsch C., Maier M., Bergs S., Bieck E., Liebert U. (2019). Influenza B virus infections in Western saxony, Germany in three consecutive seasons between 2015 and 2018: Analysis of molecular and Clinical features. *Vaccine.* 37: 6550-6557.

Hun L. (2009). El virus influenza. *Acta Pediatr. Costarric.* 21 (1): 5-7.

Hutchinson E. (2018). Influenza virus. *Trends in Microbiology.* 26 (9): 809-810.

- Ison M. (2017). Antiviral treatments. *Clin. Chest. Med.* 38: 139-153.
- Jennings L., Huang QS., Barr I., Lee PI., Kim WJ., Buchy P., Sanicas M., Mungall B., Chen J. (2018). Literature review of the epidemiology of influenza B disease in 15 countries in the Asia-Pacific region. *Influenza Other Respi Viruses.* 12: 383-411.
- Kormuth KA., Lin K., Qian Z., Myerburg MM., Marr LC., Lakdawala SS. (2019). Environmental persistence of influenza viruses is dependent upon virus type and host origin. *mSphere.* 4 (4): 1-14 e00552-19.
- Koutsakos M., Nguyen T., Barclay W., Redzierska K. (2016). Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiol.* 11 (1): 119-135.
- Krol E., Rychlowska M. y Szewczyk B. (2014). Antivirals-current trends in fighting influenza. *Acta Biochim. Pol.* 61 (3): 495-504.
- Laurie K., Horman W., Carolan L., Fer K., Layton D., Bean A., Vijaykrishna D., Reading P., McCaw J., Barr I. (2018). Evidence for viral interference and cross-reactive protective immunity between influenza B virus lineages. *JID.* 217: 548-559.
- Lei N., Wang H., Zhang Y., Zhao J., Zhong Y., Wang Y., Huang L., Ma J., Sun Q., Yang L., Shu Y., Li S. y Sun L. (2019). Molecular evolution of influenza B virus during 2011-2017 in Chaoyang, Beijing, suggesting the free influenza vaccine policy. *Sci. Rep.* 9: 2432.
- Lorene T., Marshall D., Wright K., Sutcliffe K. y Sowden A. (2017). Seasonal influenza vaccination of healthcare workers: systematic review of qualitative Evidence. *BMC Health Serv. Res.* 17: 732-740.
- Lorieau J., Louis J. y Bax A. (2013). The impact of influenza hemagglutinin fusion peptide length and viral subtype on its structure and dynamics. *Biopolymers.* 99 (3): 189-195.
- Mandala V., Liao SY., Gelenter M. y Hong M. (2019). The transmembrane conformation of the influenza B virus M2 protein in lipid bilayers. *Sci. Rep.* 9: 3725.

- Manjarrez M., y Arenas G. (1999). Virus influenza: Enigma del pasado y del presente. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 12 (4): 290-299.
- Mateos S. (2008). Virus respiratorios. P. 505. En: Departamento de Bacteriología y Virología. *Temas de Bacteriología y Virología médica*. Oficina del libro FEFMUR. Montevideo.
- Mont A. (2000). Epidemiology and Virology of influenza illness. *Am. J. Monag. Care.* 6 (suppl 5): 255-264.
- Noda A., Vidal L., Araña M., Cosal A. (2010). Mecanismos biológicos implicados en el comportamiento epidemiológico y patogénico de la influenza. *Rev. Cubana Pediatr.* 82 (2): 1-11.
- Nucamendi G. (2014). *Influenza documento técnico*. Secretaria de Salud. DGE. P. 42.
- OMS. (2009). *Programa mundial de la OMS de investigaciones de salud pública sobre la gripe*. Versión 1. Programa Mundial de la Gripe. P.22.
- Ortin J. (2004). *Biología molecular del virus de la gripe*. P. 35-37.
- Owusu D., Hard J., Tenforde M., Feldstein L., Da Silva J., Barnes J., Lee G., Tran J., Sokol T., Fry A., Brammer L., Rolfes M. (2020). Early season pediatric Influenza B/Victoria virus infections associated with a recently emerged virus subclade-Louisiana, 2019. *MMWR.* 69 (2): 43.
- Palekar R., Rodríguez A., Ávila C., Barrera G., Barrera M., Brenes H., Bruno A., El Omeiri N., Fasce R., Ferreira W., Franco D., Huaranga M., Lara J., Loayza R., Lopez-Martínez I., de Paiva T., Medina J., Ojeda J., Ropero A., Sotomayor V., Vázquez C., Vontrolch M. (2019). Patterns of influenza B circulation in Latin America and the Caribbean, 2010-2017. *PLoS ONE.* 14 (8): 1-11.
- Pielak R., Oxenoid K. y Chou J. (2011). Structural investigation of rimantadine inhibition of the AM2-BM2 chimera channel of influenza viruses. *Structure.* 19: 1655-1663.

Piñon A. (2013). *Caracterización molecular de los virus influenza A y B en Cuba durante el periodo 2006-2010 y de marcadores inmunológicos relacionados a la gravedad de la enfermedad*. Instituto de medicina tropical Pedro Kouri. La Habana. P. 100.

Poland G. (2018). Influenza Vaccines failure: failure to protect or failure to understand?. *Expert. Rev. Vaccines*. 17 (6): 495-502.

Prachayangprecha S., Makkoch J., Suwannakorn K., Vichaiwattana P., Korkong S., Theamboonless A., Poovorawan Y. (2013). Epidemiology of seasonal influenza in Bangkok between 2009 and 2012. *J. Infect. Dev. Ctries*. 7 (10): 734-740.

Prado-Calleros H. y Prado-Abarca A. (2018). Evidencias para el diagnóstico y tratamiento de influenza en adultos. *Aten. Fam*. 25 (3):118-122.

Prats G. (2013). *Microbiología y parasitología médicas*. Editorial Médica panamericana. Pp: 601.

Qiao H., Armstrong R., Melikyan G., Cohen F. y White J. (1999). A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusión peptide displays a hemifusion phenotype. *Mol. Biol. Cell*. 10: 2759-2769.

Ranaweera A., Ratnayake P. y Weliky D. (2018). Stabilities of the soluble ectodomain and fusión peptide hairpins of the influenza virus hemagglutinin subunit II protein are positively-correlated with membrane fusión. *Biochemistry*. 57 (37): 5480-5493.

Rivas M. (2020). *Circulación del virus Influenza B en Uruguay: Epidemiología y diversidad genética*. Universidad de la Republica. Uruguay. P. 123.

Rizzo C., Rezza G. y Ricciardi W. (2018). Strategies in recommending influenza vaccination in Europe and US. *Hum. Vaccin. Immunother*. 4 (3): 693-698.

Ruiz-Matus C., Ruri-Morales P., Narro-Robles J. (2017). Comportamiento de las temporadas de influenza en México de 2010 a 2016, análisis y prospectiva. *Gac. Med. Mex*. 153: 205-213.

Saldías F. (2013). Recomendaciones para el diagnóstico, manejo y prevención de la influenza en Chile. Período 2013. *Rev. Chil. Enf. Respir.* 29: 31-38.

Sanji T. (2009). Influenza A: Understanding the viral life cycle. *Yale. J. Biol. Med.* 82 (4): 153-159.

Skehel J., Cross K., Steinhaver D. y Wiley D. (2001). Influenza fusión peptides. *Biochem. Soc. Trans.* 29 (4): 623-626.

Sharabi S., Drori Y., Micheli M., Friedman N., Orzitzer S., Bassal R., Glatman-Freedman A., Shohat T., Mendelson E., Hidiyen M. y Mandelboim M. (2016). Epidemiological and virological characterization of influenza B virus infection. *PLoS one.* 11 (8): e0161195.doi:10.1371/journal.pone.0161195.1-12.

Shu B., Kirby M., Warnes C., Sessions W., Dars W., Liu J., Wilson M., Lindstrom S., Wentworth D. y Barnes J. (2020). Detection and discrimination of influenza B Victoria lineage deletion variant viruses by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 25 (41): pii=1900652. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.41.1900652>.

Smetana J., Chlibek R., Shaw J., Splino M. y Prymula R. (2018). Influenza vaccination in the elderly. *Hum. Vaccin. Immunother.* 14 (3): 540-549.

Solórzano-Santos F. y Miranda-Novales M. (2009). Influenza. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 66: 461-473.

Su S., Fu X., Li G., Kerlin F. y Veit M. (2017). Novel influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence.* 8 (8): 1580-1591.

Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud. (2013). *Plan nacional para la preparación y respuesta ante la intensificación de la influenza estacional o ante una pandemia de influenza.* Centro Nacional de Programas preventivos y control de enfermedades. Secretaria de salud. México. P. 212.

Sun W., Kirkpatrick E., Ermler M., Nachbagauer R., Broecker F., Krammer F. y Palese P. (2019). Development of influenza B Universal vaccine candidates using the "Mosaic" Hemagglutinin approach. *J. Vir.* 93 (12): 1-17.

Tafalla M., Buijssen M., Geets R., Noordegraaf-Schouten M. (2016). A comprehensive review of the epidemiology and Disease burden of influenza B in 9 European countries. *Hum. Vaccin. Immunother.* 12 (4): 993-1002.

Te Velthuis A. y Fodor E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: nsights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (8): 479-493.

Valesan A., Fitzsimmons W., McCrone J., Petrie J. Monto A., Martin E., Luring A. (2020). Influenza B viruses exhibit lower within-host diversity tan influenza A viruses in Human hosts. *J. Vir.* 94 (5): 1-14 e01710-19.

Virk R., Jayakumer J., Mendenhall I., Moorthy M., Lam P., Linster M., Lim J., Lin C., Oon L., Lee H., Koay E., Vijaykrishna D., Smith G., y Su Y. (2020). Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *PNAS.* 117 (1): 619-628.

Wang Y., Hu D., Wu Y. y Ying T. (2020). Recent advances in “universal” influenza virus antibodies: the rise of a hidden trimeric interface in hemagglutinin globular head. *Front. Med.* 1-11.

Weissenhorn W., Hinz A. y Gaudin Y. (2007). Virus membrane fusion. *FEBS Letters.* 581: 2150-2155.

Xu J. y Peng Z. (2015). People at risk of influenza pandemics: The evolution of perception and behavior. *PLoS ONE.* 10 (12): 1-14.

Xu Z., Li Z., Hu W. (2020). Global dynamic spatiotemporal pattern of seasonal influenza since 2009 influenza pandemic. *Infect. Dis. Poverty.* 9 (2): 1-9.

Yang J., Lau Y., Wu P., Feng L., Wang X., Chen T., Ali S., Peng Z., Fang V., Zhang J., He Y., Lau E., Qin Y., Yang J., Zheng J., Jiang H., Yu H., Cowling B. (2018). Variation in influenza B virus epidemiology by lineage, China. *Emerg. Infect. Dis.* 24 (8): 1536-1540.

Zhag Z., Zhang H., Xu L., Guo X., Wang W., Ji Y., Lin C., Wang Y., Wang X. (2020). Selective usage of ANP32 proteins by influenza B virus polymerase: Implications in determination of host range. *PLoS Pathog.* 16 (10): 1-24 e1008989.

