



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PEDECIBA BIOLOGÍA – Opción MICROBIOLOGÍA

TESIS DE MAESTRÍA

CIRCULACIÓN DEL VIRUS INFLUENZA B EN URUGUAY: EPIDEMIOLOGÍA Y DIVERSIDAD GENÉTICA

María José Rivas Amiassorho

Marzo 2020

Tutor: Dra. Natalia Goñi

Co-Tutor: Dra. Dora Ruchansky

Lugar de trabajo: Centro Nacional de Referencia de Influenza. Laboratorio de Virología del Departamento de Laboratorios del Ministerio de Salud.

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Listado de abreviaturas.....	6
1. Clasificación y nomenclatura.....	7
2. Morfología y estructura del virus.....	7
3. Ciclo viral.....	9
3.1. Adsorción, entrada y transporte de los RNPv	9
3.2. Transcripción y síntesis proteínas virales.....	12
3.3. Replicación.....	13
3.4. Empaquetamiento y ensamble.....	13
3.5. Brotamiento y liberación.....	14
4. Genoma viral.....	14
5. Glicosilación de los virus Influenza.....	17
6. Hemaglutinina.....	20
6.1. Sitios antigénicos.....	21
6.2. Sitio de unión al receptor.....	24
7. Neuraminidasa	24
8. Ecología.....	26
9. Manifestaciones clínicas de la infección causada por el VIB y epidemiología	26
10. Estacionalidad	29
11. Evolución.....	30
11.1. Linajes del virus Influenza B	31
11.2. Patogenicidad	33
11.3. Balance HA:NA.....	34
11.4. Evolución de glicoproteínas de superficie	35
11.5. Reordenamientos	38
12. Inmunidad.....	39
13. Tratamiento y prevención	42
13.1. Vacunas.....	42
13.2. Nuevas tecnologías de suministro y fabricación.....	47
13.3. Tratamiento y profilaxis con drogas antivirales.....	48
14. Resistencia entre los VIB a los INA.....	49
15. Vigilancia.....	51
16. Diagnóstico	52
17. Objetivos.....	54
17.1. Objetivo general.....	54
17.2. Objetivos específicos.....	54

18. Materiales y métodos	55
18.1. Vigilancia Influenza y recolección de muestras	55
18.2. Métodos estadísticos	55
18.3. Detección molecular de VIB.....	55
18.3.1. Extracción de ARN y ensayos RT-PCR en tiempo real.....	55
18.3.2. PCR Convencional y electroforesis	56
18.3.3. Purificación de bandas y secuenciación	57
18.3.4. Datos de secuencias y análisis filogenéticos de los genes HA y NA de VIB	57
18.3.5. Variaciones en secuencias aminoácidas y sitios de glicosilación	58
19. Resultados	59
19.1. Detección molecular de los VIB circulantes en Uruguay.....	59
19.1.1. Análisis Filogenético. Gen HA	59
19.1.2. Análisis filogenéticos. Gen NA	63
19.2. Sustitución de aminoácidos en la región HA1.....	66
19.2.1. Sitio unión al receptor y sitios de glicosilación	68
19.3. Sustitución de aminoácidos en la NA.....	69
19.3.1. Sustituciones en sitio activo, sitios de glicosilación y sitios de resistencia.....	72
19.4. Distribución de edades según tipo de vigilancia.....	72
19.5. Prevalencia de los virus influenza B en Uruguay	73
19.6. Interacción entre VIA y VIB.....	74
19.7. Concordancia entre cepas circulantes y cepas vacunales	76
Discusión.....	78
Conclusiones	82
Referencias.....	83
Anexos.....	111
Anexo 1. Números de accesos en GISAID.....	111
Anexo 2. Sustituciones de aa en HA1 del linaje B/Victoria en cepas uruguayas.....	112
Anexo 3. Sustituciones de aa en HA1 del linaje B/Yamagata en cepas uruguayas.....	113
Anexo 4. Sustituciones de aa en NA del linaje B/Victoria en cepas uruguayas.....	114
Anexo 5. Sustituciones de aa en NA del linaje B/Yamagata en cepas uruguayas	115
Anexo 6. Sustituciones de aminoácidos en HA1 del linaje B/Victoria.....	116
Anexo 7. Sustituciones de aminoácidos en HA1 del linaje B/Yamagata	117
Anexo 8. Sustituciones de aminoácidos en NA del linaje B/Victoria	118
Anexo 9. Sustituciones de aminoácidos en NA del linaje B/Yamagata	119
Anexo 10. Sitios de glicosilación en HA1 en linaje B/Victoria	120
Anexo 11. Sitios de glicosilación en HA1 en linaje B/Yamagata	121
Anexo 12. Sitios de glicosilación en NA del linaje B/Victoria.....	122
Anexo 13. Sitios de glicosilación en NA del linaje B/Yamagata.....	123

Agradecimientos

A PEDECIBA Biología por haberme aceptado en su programa de estudio.

Al Ministerio de Salud por autorizar a realizar mi pasantía de Maestría en su Institución.

A mis dos tutoras la Dra. Natalia Goñi y la Dra. Dora Ruchansky por brindarme la oportunidad de ser parte de este proyecto de investigación y por haberme apoyado todos estos años de infinitas maneras, con sus aportes, conocimientos, dedicación y generosidad.

Al Gerente General y al Gerente de Recursos Humanos del Laboratorio Roemmers por permitirme seguir siendo parte del equipo de trabajo y brindado todo su apoyo para transitar estos casi tres años de estudio. A mi Jefe directo y compañeros de la nueva sección por haberme recibido con tanto cariño y haberme apoyado todo este tiempo.

A los miembros del tribunal, el Dr. Juan Cristina, la Dra. Adriana Delfraro y la Dra. Mariana Baz por haber aceptado evaluar este trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Arbiza y a la Dra. Andrea Blanc por ser mis primeros mentores en Influenza.

A Gabriel mi compañero de todos los días y todos los momentos, por brindarme su amor incondicional y a Santiago por todo el cariño e interés constante

Resumen

Cada año, millones de personas en todo el mundo desarrollan enfermedades agudas respiratorias causadas por los virus de Influenza A y B. Ambos virus son los responsables de las epidemias estacionales causando morbilidad y mortalidad severas en todo el mundo (Nelson and Holmes 2007; Taubenberger and Morens 2008).

La enfermedad que es causada por los virus de Influenza B (VIB) se ve eclipsada por las epidemias estacionales y los brotes pandémicos causados por el virus de Influenza A (VIA). Sin embargo, estudios recientes sugieren que se subestima la contribución por parte del tipo B a la estacionalidad observada para el virus Influenza observando que pueden llegar a tener tasas de mortalidad comparables con el tipo A en algunas epidemias (McCullers and Hayden 2012; Paddock et al. 2012; Caini et al. 2017).

Mientras que los brotes anuales de Influenza en la población humana inducen la generación de anticuerpos neutralizantes contra la Hemaglutinina (HA) y en menor medida contra la Neuraminidasa (NA) de las cepas circulantes, nuevas cepas surgen constantemente en un proceso denominado deriva antigénica. Este fenómeno presenta un desafío a la salud pública debido a la necesidad de ajustar la composición de la vacuna estacional cada año para proporcionar protección contra las variantes antigénicas circulantes (York et al. 2019).

La predicción de la dinámica de los linajes del VIB para la próxima estación es uno de los mayores obstáculos para el diseño de una apropiada vacuna trivalente por lo que es de gran importancia la selección del linaje correcto para obtener una alta eficacia vacunal (Nyirenda et al. 2016). A pesar del número limitado de linajes de este virus, la gran diversidad genética dentro de los linajes y la antigenicidad cambiante con el tiempo especialmente para el linaje B/Victoria hace difícil la predicción de cuál será el linaje dominante (Vijaykrishna et al. 2015; Nyirenda et al. 2016). Aunque la vacuna cuadrivalente incluye ambos linajes del VIB (B/Yamagata y B/Victoria), la vigilancia y la selección de cada cepa vacunal siguen siendo necesarias debido a que las vacunas trivalentes son las más utilizadas en todo el mundo y además la rentabilidad de las vacunas cuadrivalentes está bajo debate (Mosterín Höpping et al. 2016).

A la fecha hay pocos datos publicados sobre la circulación de los VIB en Latino América (Palekar et al. 2019).

Para el presente estudio se utilizaron datos de la vigilancia virológica y epidemiológica que se realizó en Uruguay durante el período 2012 a 2019. Estos datos se obtuvieron de pacientes con enfermedades similares a la Influenza (ETI) o de pacientes con enfermedad aguda respiratoria grave (IRAG). Se determinaron las relaciones filogenéticas entre las cepas circulantes de VIB en Uruguay y cepas de la región así como el análisis filogenético de secuencias de HA y de la NA junto con las cepas vacunales utilizadas para el hemisferio sur en dicho período. El análisis filogenético revela que en nuestro país co-circularon los dos linajes del VIB en casi todas las temporadas y evidencia que no hubo coincidencia de la cepa vacunal con las cepas circulantes en un tercio de las temporadas estudiadas. Los resultados epidemiológicos muestran que la proporción del VIB encontrada en pacientes con ETI considerando todas las franjas etarias fue significativamente mayor que los observados en los pacientes IRAG (9.7% y 3.2% respectivamente). Por otro lado, se observó que los pacientes entre 5 y 14 años fueron el grupo más afectado por infecciones con el VIB ($p < 0.05$) y que pacientes mayores a 25 años fueron particularmente vulnerables a infecciones con el linaje B/Yamagata.

Listado de abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	ARN complementario
ARNm	ARN mensajero
ARNv	ARN viral
BM2	Proteína de Matriz 2 en VIB
CC	Centros Colaboradores
CDC	Centro para la prevención y control de enfermedades
CNI	Centro Nacional de Influenza
ETI	Enfermedades similares a la Influenza
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
GISN	Red de vigilancia mundial de Influenza de la OMS
HA	Hemaglutinina
INA	Inhibidores de la Neuraminidasa
IRAG	Enfermedad aguda respiratoria grave
M	Proteína Matriz
NA	Neuraminidasa
NB	Proteína de membrana NB
NCR	Regiones no codificantes
nm	Nanómetros
MDCK	Línea celular derivada de células de riñón de perro
NEP	Proteína de exportación nuclear
NLS	Señales de localización nuclear
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Polimerasa ácida
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
RBS	Sitio de unión al receptor
RNPv	Ribonucleoproteína viral
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
rtRT-PCR	RT-PCR en tiempo real
VIB	Virus Influenza B
VIA	Virus Influenza A
VIC	Virus Influenza C
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros

1. Clasificación y nomenclatura

La familia *Orthomyxoviridae* está compuesta por virus envueltos de ARN segmentados y de sentido negativo. Tres géneros pertenecientes a esta familia denominados Influenza A, B y C, infectan a humanos. Entre los tres tipos de influenza, el tipo A es el que causa mayores inconvenientes a la salud pública debido a su capacidad de generar no solo epidemias estacionales sino también pandemias originadas por infecciones zoonóticas (Taubenberger and Kash 2010; Hayward et al. 2014). El virus de Influenza B (VIB) aún no se ha asociado con pandemias pero causa epidemias estacionales y es responsable de aproximadamente el 25% de las infecciones humanas causadas por la influenza estacional (Paul Glezen et al. 2013). En conjunto, las epidemias estacionales de VIA y VIB pueden causar hasta 5 millones de infecciones y provocar 500.000 muertes anuales (Glezen 2008). El virus tipo C (VIC) generalmente causa enfermedades respiratorias leves (Joosting et al. 1968) y en contraste con los otros dos anteriores no se incluye en la composición de la vacuna estacional contra la gripe.

Los virus Influenza A, B y C son clasificados de acuerdo a su capacidad de reacción serológica de sus proteínas internas: Nucleoproteína (NP) y Matriz (M) (Wright, P 2007). Los virus de influenza B (VIB) no se dividen en subtipos. Actualmente, los VIB que circulan pertenecen a dos linajes que son genética y antigénicamente diferentes y son referidos como B/Yamagata o B/Victoria (Rota et al. 1990; Kanegae et al. 1990; Shaw et al. 2002). Cada uno de estos dos linajes logra el predominio en diferentes momentos y en diferentes regiones geográficas como lo indican las recomendaciones para su inclusión en vacunas contra la gripe (Shaw et al. 2002).

El sistema de nomenclatura para los virus Influenza fue aceptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1979 y publicado en febrero de 1980. Este sistema requiere que se describa el tipo de virus, el sitio geográfico del aislamiento, número de cepa y el año de aislamiento. Por ejemplo, B/Brisbane/60/2008 (WHO, Memorandum 1980)

2. Morfología y estructura del virus

Por microscopía electrónica se observa que las partículas virales pueden ser de forma esférica con diámetros de 100 nm o de forma filamentosa con longitudes mayores a 300 nm (Bouvier and Palese 2008). Sin embargo, al realizar pasajes en células MDCK o en huevos embrionados las formas filamentosas generalmente se pierden (Seladi-Schulman et al. 2013). (Figura 1).

Por debajo de la membrana viral y cubriendo toda la superficie del virión se encuentra la proteína de matriz (M1) que rodea a todo el núcleo viral. Interno a la M1 se encuentra la proteína de exportación nuclear (NEP por sus siglas en inglés “nuclear export protein” también llamada NS2 por sus siglas en inglés “non-structural protein 2”) (Palese, P.S. 2007; Bouvier and Palese 2008; Resa-Infante et al. 2011).

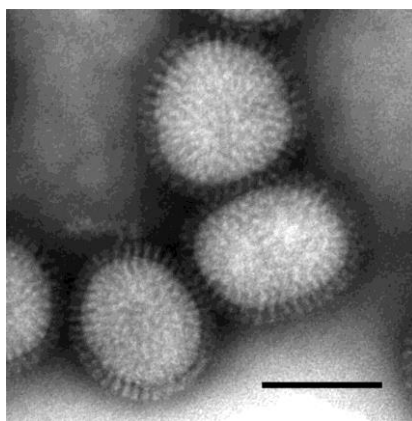


Figura 1. Viriones de influenza purificados y visualizados por microscopía electrónica con tinción negativa. Los viriones esféricos de aproximadamente 120 nm de diámetro están cubiertos por espículas compuestas de Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA). Bar; 100 nm. Tomado de (Noda and Kawaoka 2010).

La envuelta lipídica de estas partículas virales deriva de la célula hospedadora e insertas en dicha membrana se encuentran los dos glicoproteínas principales que son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) y en menor número se encuentran la proteína BM2 que forma canales iónicos y la proteína NB (Wright, P 2007). Las espículas de HA y NA tienen un largo de entre 10 y 14 nm y la HA es la proteína más abundante de la envuelta viral seguida por la NA y por BM2 (Wright, P 2007; Hutchinson et al. 2014). Estudios de tomografía crioeléctrica han indicado que la NA existe sobre la superficie del virión como agrupamientos locales formando “parches” o como espículas aisladas rodeadas de HA (Harris et al. 2006). (Figura 2).

Los genomas de los virus Influenza como todos los virus de ARN de polaridad negativa no se encuentran desnudos dentro del virión sino que forman complejos ribonucleoproteicos virales (RNPv por su sigla en inglés “ribonucleoprotein viral”). Los complejos RNP son estructuras superenrolladas que consisten en segmentos de ARN viral (ARNv) rodeados de la nucleoproteína (NP) y con una copia del complejo polimerasa (formado por dos polimerasas básicas PB1 y PB2 y una polimerasa ácida PA) en el extremo 5' del ARNv (Palese, P.S. 2007; Bouvier and Palese 2008; Noda and Kawaoka 2010; Resa-Infante et al. 2011) (Figuras 2 y 4).

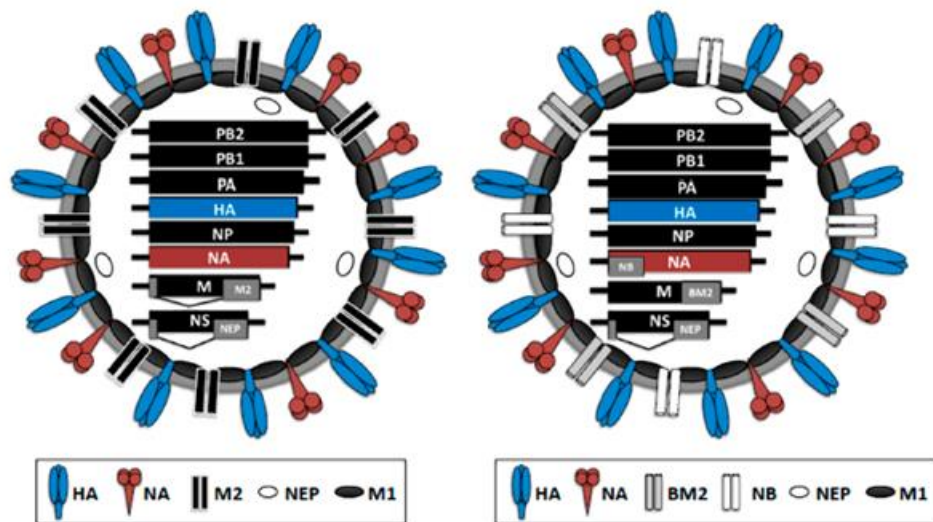


Figura 2. Representación y comparación de las estructuras de los viriones del virus Influenza A, VIA (a la derecha) y del virus Influenza B, VIB (a la izquierda). Ambos están rodeados por una bicapa lipídica que contienen a los dos principales antígenos de superficie que son las glicoproteínas virales: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Además, en la membrana del virión se encuentra el canal iónico M2 en VIA o BM2 en VIB. Por otro lado, la membrana de los viriones de VIB también contiene proteínas NB. Debajo de la bicapa lipídica viral hay una capa de proteína compuesta por la proteína de matriz M (M1) y la proteína de exportación nuclear (NEP). Dentro de los viriones, se indican los ocho segmentos virales y sus respectivos productos proteicos. Las líneas negras al final y al principio de cada uno de los ocho segmentos indican las regiones no codificantes (NCR). El complejo polimerasa está formado por, PB1 y PB2, que son las polimerasas básicas 1 y 2 respectivamente y por PA que es la polimerasa ácida. NP indica a la nucleoproteína. NS indica el gen no estructural. Extraído de (Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

3. Ciclo viral

3.1. Adsorción, entrada y transporte de los RNPv

La infección con los VIB comienza cuando reconocen el ácido N-acetilneuraminico (ácido siálico) que se encuentra en la superficie de las células. El ácido siálico es un monosacárido ácido que tiene un compuesto base de nueve átomos de carbono y que comúnmente es encontrado en los extremos terminales de muchos glicoconjugados por lo que estos receptores son ubicuos en muchos tipos celulares y en muchas especies de animales (Skehel and Wiley 2000; Bouvier and Palese 2008). Los virus Influenza escanean la superficie celular en busca del receptor adecuado mediante la remoción de los ácidos siálicos locales haciendo uso de la función sialidasa de la NA (Yang et al. 2014, 2016; Sakai et al. 2017).

La barrera de mucosas del hospedador impiden que la HA viral se una a los residuos de ácido siálico de los receptores encontrados en la superficie de la célula huésped (Matrosovich et al. 2004; Cohen et al. 2013; Yang et al. 2014). Las mucosas expresan naturalmente receptores “señuelos”, como por ejemplo mucinas glicosiladas, que pueden neutralizar al virus uniéndose a la HA y evitando que llegue a la célula huésped (Cohen et al. 2013; Ma et al. 2018). Cuando esto ocurre, la NA viral puede liberar a las partículas virales que se hayan unido a estas barreras escindiendo el ácido siálico terminal de los glicanos del receptor “señuelo” y permitiendo que la HA

acceda y se una a los receptores de ácido siálico unidos al receptor (Cohen et al. 2013; Yang et al. 2014).

El carbono-2 del ácido siálico terminal puede unirse al carbono-3 o al carbono-6 de la galactosa formando uniones α -2,3 o α -2,6 respectivamente; estos enlaces diferentes dan como resultado una única configuración estérica para el ácido siálico terminal. La HA reconoce con especificidad los residuos de ácido siálico unidos al monosacárido por enlaces α -2,3 o α -2,6. En las células epiteliales de la traquea humana predominan los residuos de ácido siálico con enlaces α -2,6 y con menos abundancia se encuentran también los enlaces α -2,3. Los residuos de ácido siálico en uniones α -2,3 son más comunes en el epitelio intestinal de las aves acuáticas (Wright, P 2007; Bouvier and Palese 2008). Evidencia sugiere que los virus B/Yamagata se unen predominantemente a receptores de ácido siálico ligados en uniones α -2,6 sobre la superficie de células del tracto respiratorio humano; mientras que los virus B/Victoria tienen capacidad de unión tanto α -2,3 como α -2,6 (Wang et al. 2012; Velkov 2013).

Una vez mediada la unión de la HA con el receptor, se dispara el proceso de internalización del virus mediante endocitosis. La endocitosis puede ocurrir mediante vesículas recubiertas de clatrina en la cual se forma una invaginación hasta formar una vesícula completa que se desprende hacia el citoplasma o puede ocurrir por otros mecanismos como por ejemplo micropinocitosis (Reading et al. 2000; Lakadamyali et al. 2004; Ng et al. 2014; Dou et al. 2018).

La acidez del compartimento endosomal es crucial para producir el desnudamiento de los virus. Los protones del endosoma ingresan a la partícula viral a través del canal formado por la proteína BM2. El bajo pH desencadena que se desestabilicen los RNPv separándose de la proteína M1 y también provoca cambios conformacionales en la HA (Skehel and Wiley 2000; Hatta et al. 2004; Bouvier and Palese 2008; Nogales and Martínez-Sobrido 2016; Dou et al. 2018). El bajo pH del endosoma tardío provoca la protonación de múltiples residuos con carga negativa ubicados en HA1–HA1 y en la interfase de HA1–HA2 disociando así las subunidades HA1 y HA2 (Korte et al. 2007; Rachakonda et al. 2007; Wang et al. 2008). El siguiente cambio conformacional ocurre en HA2 que expone el péptido de fusión provocando la fusión de las membranas viral y endosomal liberando el contenido del virión en el citoplasma celular a través de la generación de un poro (Bullough et al. 1994; Chen et al. 1999).

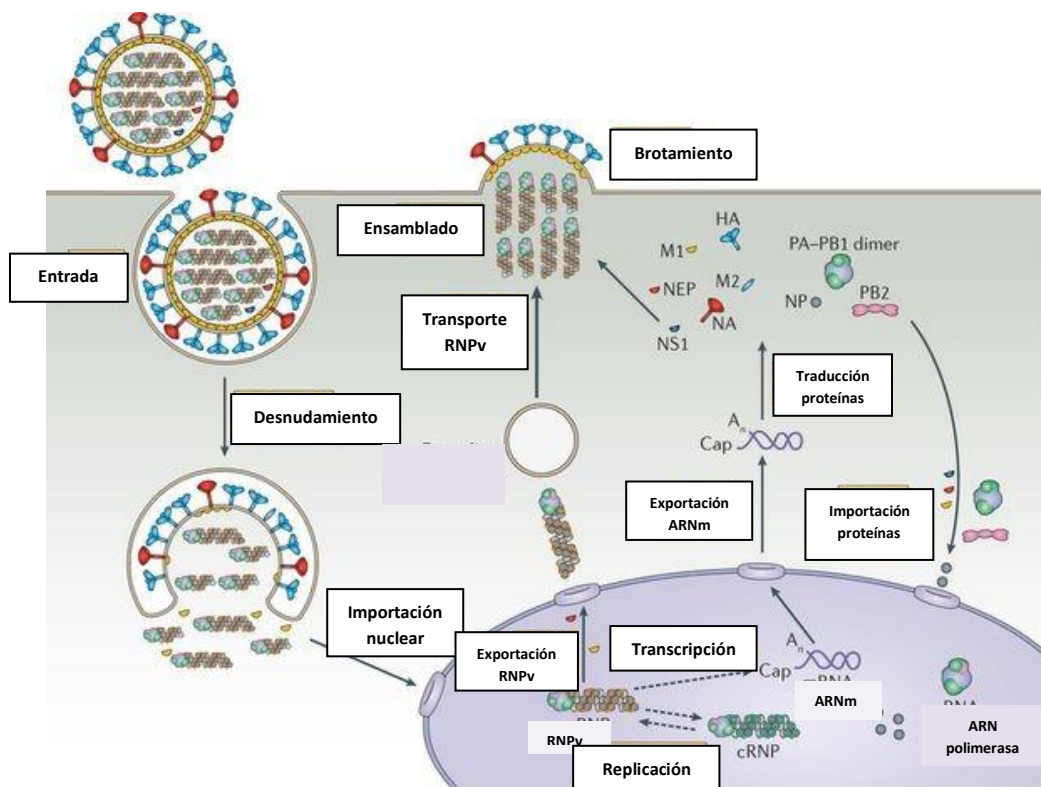


Figura 3. Ciclo viral del virus Influenza en la célula hospedadora. Los pasos más relevantes del ciclo viral son: Adsorción y entrada. Desnudamiento y migración al núcleo celular. Transcripción y replicación viral. Transporte de los ARNm virales al citoplasma dónde ocurre la traducción y modificación de las proteínas, algunas de estas proteínas regresan al núcleo para formar los RNPv y otras son transportadas directamente hacia la superficie celular. Transporte de los RNPv a la superficie celular dónde tiene lugar el ensamblado. Brotamiento. Extraído y modificado de (Te Velthuis and Fodor 2016).

Una vez liberados del virión, los RNPv son dirigidos al núcleo de la célula huésped a través de señales de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés de “nuclear localization signals”) que se encuentran en las proteínas virales (Bouvier and Palese 2008). El transporte y la entrada al núcleo de los RNPv depende de la maquinaria celular y de sus vías de transporte, el modelo actual sugiere que utilizan las importinas α y β para ingresar activamente al núcleo (Hutchinson and Fodor 2012; Labaronne et al. 2017; Dou et al. 2018).

Cuatro proteínas son necesarias para la replicación viral, la NP y las tres proteínas que forman el complejo polimerasa PB1, PB2 y PA. Todas estas proteínas tienen señales de localización nuclear que facilitan la importación de cada complejo RNPv al núcleo (Plant and Ye 2013). La NP que es el mayor componente estructural de los complejos RNPv tiene un rol crucial en las etapas de transcripción y replicación del genoma viral (Ng et al. 2012).

La ARN polimerasa ARN dependiente viral, es un componente del complejo polimerasa que es importado junto con los RNPv al núcleo, y utiliza como plantilla a los ARNv de sentido negativo para sintetizar dos especies de ARN de sentido positivo: ARNm virales para la producción de proteínas virales en el citoplasma y ARN complementario (ARNc) que es un intermediario utilizado

por la polimerasa viral para generar más transcritos de sentido negativo que son los ARNv genómicos (Bouvier and Palese 2008; Dou et al. 2018). (Figura 4).

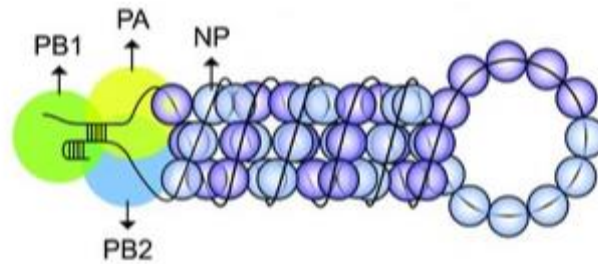


Figura 4. Representación de un segmento de RNPv. La polimerasa es un heterodímero que contiene las proteínas PA, PB1 y PB2 y se encuentra unido a cada segmento de RNPv dentro del virión. Estos RNPv tienen una estructura de horquilla de doble hélice que consiste de dos cadenas antiparalelas de ARNv que se encuentran recubiertas por moléculas de NP. Extraído y modificado de (Stevaert and Naesens 2016).

3.2. Transcripción y síntesis proteínicas virales

La transcripción de ARNm virales a partir de las plantillas de ARNv depende del uso de la ARN polimerasa II celular por lo que los virus Influenza utilizan un mecanismo denominado del inglés “cap-snatching” para obtener cebadores. En este proceso la subunidad PB2 de la ARN polimerasa viral corta la región 5' cap de los ARNm celulares y el dominio PA del complejo polimerasa procesa esa región. Luego ocurre una rotación de las subunidades quedando expuesto el dominio catalítico de la subunidad PB1 con lo que se extiende el ARNv a partir del molde (Bouvier and Palese 2008; Dou et al. 2018).

El proceso de cap-snatching aumenta la eficiencia de un proceso de apagado celular (denominado en inglés como “host shut-off”) causando la inhibición de la elongación de los transcritos celulares y provocando su degradación (Chan et al. 2006; Rodriguez et al. 2007; Vreede et al. 2010), un mecanismo que parece contribuir a la virulencia (Rodriguez et al. 2009). Como la transcripción viral, a diferencia de la replicación, depende de la polimerasa II y por ende de la generación de transcritos con cap, la supresión de la síntesis de la polimerasa celular a medida que avanza la infección podría contribuir a la disminución de la síntesis ARNm virales en etapas tardías de la infección (Vreede and Fodor 2010).

A diferencia del ARNm de la célula huésped en la cual la poliadenilación en el extremo 3' está dirigido por una polimerasa específica de poli(A), en los virus Influenza es diferente y la poliadenilación está dirigida por un tramo de 5 a 7 residuos de Uracilo (polyU) en los ARNv. Como la síntesis de los ARNm ocurre desde el extremo 3' a 5', al llegar al extremo 5' y encontrarse con que la PB1 permanece unido se da un fenómeno de tartamudeo (“stuttering” del inglés) que genera la copia repetida del tramo polyU (Bouvier and Palese 2008; Dou et al. 2018).

Luego de la exportación de los ARNm al citoplasma, estos tienen dos destinos posibles dirigirse hacia los ribosomas citosólicos (para los segmentos PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 y M1) o dirigirse hacia los ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso (para HA, NA y M2). Las

proteínas de la envoltura HA, NA y M2 se sintetizan a partir de ARNm viral en ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico donde se pliegan y son dirigidas hacia el aparato de Golgi para las modificaciones postraduccionales. Estas tres proteínas tienen señales que las dirigen posteriormente a la superficie apical de la membrana celular para el ensamblaje de las partículas virales (Bouvier and Palese 2008). Se cree que M1 tiene un rol importante en poner en contacto el complejo RNP-NEP con las proteínas HA, NA y M2 unidas a la envoltura para el empaquetamiento en la célula huésped (Bouvier and Palese 2008; Chaimayo et al. 2017).

3.3. Replicación

La replicación es un proceso cebador independiente que ocurre en dos pasos. En el primer paso se produce un intermediario replicativo de sentido positivo denominado ARNc y en el segundo paso este ARNc actúa como molde para la síntesis de los ARNv (Te Velthuis and Fodor 2016).

Que ocurra la transcripción y la replicación en el núcleo de la célula huésped proporciona al virus Influenza una amplia variedad de beneficios como tener acceso a la maquinaria de procesamiento alternativo celular, que se de eficientemente el proceso de cap-snatching, incrementar el apagado traduccional de los mensajeros celulares priorizando los virales y la evasión de la respuesta antiviral. Sin embargo, la entrada al núcleo es un proceso que está regulado por la maquinaria celular como también la traducción que depende de factores celulares (Hutchinson and Fodor 2012).

3.4. Empaquetamiento y ensamble

Luego de la replicación, las nuevas proteínas sintetizadas en el citoplasma PA, PB1, PB2 y NP son enviadas al núcleo para formar los RNPv junto con los ARNv recién sintetizados. Luego ingresan al núcleo M1 y NEP que son esenciales para la migración hacia el citoplasma como también para el ensamblaje de la progenie viral (Cros and Palese 2003). A diferencia de lo que ocurre en la exportación de los ARNm virales al citoplasma, la exportación nuclear de segmentos de ARNv está mediada por las proteínas virales: M1 y NEP/NS2. La proteína M1 interactúa con los ARNv y con NP por lo que se cree que es la que mantiene a los complejos RNP juntos. Por otro lado, M1 también se asocia con la proteína NEP que media la exportación de los complejos M1-RNP a través de los poros de la membrana nuclear (Cros and Palese 2003; Bouvier and Palese 2008; Dou et al. 2018).

Para que una partícula viral sea infecciosa debe contener el genoma completo de ocho segmentos (Hutchinson et al. 2010; Rossman and Lamb 2011; Bolte et al. 2019). Anteriormente, se pensaba que el empaquetado del ARNv era un proceso totalmente aleatorio en el que los segmentos eran incorporados al azar y solo aquellas partículas con genoma completo eran infectivas. Sin embargo, la evidencia más reciente sugiere que el empaquetamiento es un proceso selectivo para lo cual todos los segmentos de ARNv tienen secuencias que actúan como señales para iniciar el proceso de ensamblado (Enami et al. 1991; Bancroft and Parslow 2002; Fujii et al. 2003; Noda and Kawaoka 2010). El empaquetamiento selectivo de los ARNv en los viriones nacientes está mediado por interacciones ARN-ARN de señales de empaquetamiento que están presentes en cada uno de los extremos de los ARNv (Gerber et al. 2014). Análisis de microscopía electrónica y tomografía electrónica demostraron que los viriones de la progenie incorporan ocho RNPv dispuestos en un patrón "1 + 7" en el cual un RNPv central está rodeado por el resto de los siete RNP (Noda and Kawaoka 2010; Nakatsu et al. 2016).

Para el proceso de ensamblado y brotamiento, los virus Influenza al igual que otros virus utilizan dominios de acumulación lipídica (del inglés “lipid raft domains”) que se encuentran en la superficie de la célula, estas regiones tienen tamaños variables y están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos (Suomalainen 2002).

3.5. Brotamiento y liberación

La agrupación de HA y NA en los dominios de acumulación lipídica puede causar una deformación de la membrana y el inicio del evento de gemación. Se cree que M1 se une a las colas citoplasmáticas de HA y NA y sirve como sitio de acoplamiento para el reclutamiento de las RNPv. También se especula que la acumulación de M1 en el lado citoplasmático y el reclutamiento de BM2 al sitio de gemación inician la fase de final del ciclo. M2 inicialmente estabiliza este sitio y posteriormente puede alterar la curvatura de la membrana provocando su escisión y la liberación de la progenia viral (Rossman and Lamb 2011).

Durante esta etapa del ciclo, la HA de las partículas virales recién formadas pueden volverse a unir a los ácidos siálicos aún expresados en la superficie de la célula huésped, evitando la liberación de partículas virales recién formadas. Sin embargo, la NA viral escinde los ácidos siálicos terminales de la célula huésped, permitiendo la liberación de estas nuevas partículas virales (Palese et al. 1974; Bouvier and Palese 2008; Nayak et al. 2009). Finalmente, una vez que los virus se liberan de las células infectadas, se pueden formar agregados de partículas virales a través de interacciones entre HA sialiladas u otras glicoproteínas presentes en la mucosa. Las partículas virales individuales pueden ser liberadas de estos agregados por acción de la actividad enzimática de la NA (Varghese et al. 1992; Bouvier and Palese 2008).

4. Genoma viral

Los VIB contienen ocho segmentos de ARN viral (ARNv) de cadena simple y sentido negativo. Los ocho segmentos, se enumeran en orden decreciente de longitud y codifican para 11 proteínas. Cada segmento contiene una región de codificación central que está flanqueada en ambos extremos por regiones terminales no codificantes (NCR por su sigla del inglés “non-coding regions”). Las NCR tienen diferentes longitudes que varían entre los diferentes segmentos génicos y también entre los diferentes tipos de Influenza (Stoeckle et al. 1987). Sin embargo, los extremos de todos los segmentos están altamente conservados entre todos los virus Influenza y contienen regiones complementarias con funciones promotoras para la replicación y la transcripción del ARNv. Las regiones no codificantes también incluyen señales de poliadenilación del ARN mensajero (ARNm) y parte de las señales de empaquetamiento para el ensamblaje de los virus. (Palese, P.S. 2007; Bouvier and Palese 2008; Gultyaev et al. 2010; Resa-Infante et al. 2011; Plant and Ye 2013).

En los VIB los segmentos 1, 2, 3, 4 y 5 codifican para una única proteína: PB2, PB1, PA, HA y NP respectivamente, mientras que los segmentos 6, 7 y 8 codifican para dos productos proteicos empleando diferentes estrategias de procesamiento alternativo del ARN (Wright, P 2007). El segmento 6 codifica en VIB tanto para la proteína NA y en un marco de lectura alternativo a -1 codifica para la proteína NB que es una proteína integral de membrana (Hatta and Kawaoka 2003; Wright, P 2007). El segmento 7 codifica en VIA y VIB para la proteína de matriz (M1) mientras que en VIB codifica en un marco de lectura alternativo a +2 para la proteína de membrana BM2 (Briedis et al. 1982; Horvath et al. 1990). Finalmente, el segmento 8 que es el más pequeño del

genoma viral de Influenza codifica las mismas dos proteínas tanto para VIA como VIB, ambos expresan la proteína NS1 y como producto del procesamiento alternativo de este segmento codifican para la proteína de exportación nuclear NEP (llamada anteriormente como proteína no estructural 2 (NS2 por sus siglas en inglés “non-estructural 2”) (Lamb et al. 1980; Briedis and Lamb 1982). Los extremos de cada segmento del ARNv forman una horquilla helicoidal con sus extremos 5' y 3' cercanos entre sí. Unido al extremo 5' se encuentra el complejo polimerasa y el resto del segmento del ARNv cargado negativamente debido a los grupos fosfatos es recubierto por completo por la NP que es rica en el aminoácido arginina (Arg) con carga positiva. El ARNv junto con la NP asociada forma un complejo denominado ribonucleoproteína viral (RNPv) que en asociación con el complejo polimerasa forman el componente mínimo involucrado en la replicación y la transcripción viral. Asociar el complejo polimerasa a cada ARNv es una estrategia que le permite al VIB realizar una primera transcripción de cada segmento a un ARN mensajero (ARNm) viral de forma independiente de la maquinaria celular (Huang et al. 1990; Neumann et al. 2004; Palese, P.S. 2007; Bouvier and Palese 2008; Plant and Ye 2013).

Los segmentos 1, 2 y 3 codifican para la polimerasa básica 1 (PB1), la polimerasa básica 2 (PB2) y la polimerasa ácida (PA) respectivamente, estas proteínas forman el complejo polimerasa heterotrimérico (Wright, P 2007; Bouvier and Palese 2008). El dominio de unión al cap está en la subunidad PB2 y el dominio endonucleasa está en la subunidad PA juntos capturan y eliminan la región cap de los ARNm celulares y lo utilizan como cebador para la síntesis de los ARNm virales. El dominio de ARN polimerasa ARN dependiente requerido para toda la producción de ARN se encuentra en la proteína PB1 (Plant and Ye 2013). La actividad del complejo polimerasa durante la transcripción y la replicación está modulada por la interacción con las plantillas de ARN, los cebadores y otros factores de virus y del huésped. La interacción entre subunidades ha sido estudiada con enfoques bioquímicos, genéticos y estructurales y de ellos se deduce que la subunidad PB1 es el núcleo del complejo y que interactúa con PA por medio de su extremo N-terminal y con PB2 a través de su extremo C-terminal (Resa-Infante et al. 2011).

El segmento 4 codifica para la glicoproteína de superficie hemaglutinina (HA) que es una proteína de unión al azúcar cuya función es facilitar la entrada del virus en las células epiteliales que tienen azúcares de ácido siálico en su superficie. Además la HA es el mayor antígeno de superficie. La región externa de esta glicoproteína consiste en dos dominios uno globular y otro denominado tallo anclado a la envoltura viral por un dominio transmembrana (Wright, P 2007).

El segmento 5 codifica para la nucleoproteína (NP) que es una proteína multifuncional y está involucrada en muchas etapas de la replicación viral (Palese, P.S. 2007; Sherry et al. 2014). Es el mayor componente de los complejos RNPv, donde cada monómero de NP se une a aproximadamente 24 nucleótidos de ARNv. También cumple funciones en la estabilización y en la compactación de los RNP (Ortega et al. 2000; Noda and Kawaoka 2010). La proteína NP participa en la transcripción y la replicación de estos complejos (Liu et al. 2015) y también tiene otros roles en la localización nuclear y en la viabilidad viral evitando la degradación del ARN por el proteosoma (Ng et al. 2012; Liu et al. 2015). Por otro lado, la región N-terminal de la NP de VIB es más extendida que la encontrada en VIA (Sherry et al. 2014; Liu et al. 2015; Labaronne et al. 2017).

El segmento 6 codifica para otra glicoproteína y el segundo mayor antígeno viral que es la neuraminidasa (NA) que tiene como función principal escindir los enlaces glicosídicos de los ácidos siálicos para liberar los viriones de las células infectadas. Al igual que HA, la glicoproteína

NA contiene dos dominios externos: uno globular y un dominio denominado tallo que está anclado a la envoltura viral por un dominio transmembrana (Wright, P 2007). La NA escinde residuos terminales de ácido siálico de glicoproteínas y gangliósidos de la superficie celular para liberar la progenie viral de la célula huésped. En virus con NA inactivo o ausente, o en presencia de inhibidores de la neuraminidasa, se observa que las partículas virales se agrupan en la superficie celular y en consecuencia se reduce la infectividad. Los anticuerpos del huésped contra la NA, así como los inhibidores de la neuraminidasa, previenen la liberación de virus de las células infectadas inhibiendo así la replicación viral (Palese, P.S. 2007; Wright, P 2007). También se cree que la NA ayuda a la infectividad del virus al descomponer las mucinas en las secreciones del tracto respiratorio y permitir que el virus penetre a través del epitelio respiratorio, por lo que puede desempeñar un papel en la entrada de virus en las vías respiratorias células epiteliales (Matrosovich et al. 2004). En VIB, el segmento 6 también codifica para una segunda pequeña proteína integral de membrana llamada NB. El marco de lectura abierto comienza a 4 nucleótidos localizados en el extremo 5' del comienzo del marco de lectura que codifica para la NA en el mismo segmento. Aunque la proteína NB es conservada en todos los genomas de VIB aparentemente no es esencial y su función sigue siendo desconocida hasta el presente (Hatta and Kawaoka 2003).

El segmento 7 de VIB codifica para dos proteínas llamadas M1 y BM2. Como función estructural las proteínas de matriz M1 forman una cubierta continua en el interior de la partícula viral por debajo de la membrana dándole forma a la partícula viral y como función en el ciclo viral esta proteína se une a los RNPv en el núcleo e inhibe la transcripción viral. Derivado de un evento de reiniciación/terminación acoplada (coupled termination/reinitiation event), el segmento 7 codifica para la homotetrámero BM2 que forma un canal iónico en la envoltura viral. Estas pequeñas proteínas integrales de membrana permiten que los protones ingresen a la partícula viral desde el endosoma. La disminución del pH en la partícula viral provoca que la proteína M1 se disocie de los RNPv liberando los mismos al citoplasma celular. Los VIA codifican una proteína M2 en una variante del procesamiento alternativo del segmento 7, esta diversidad en la codificación y la expresión de proteínas con funciones similares también puede ser una razón por la cual no se han aislado de la naturaleza virus reordenantes con segmentos génicos de diferentes tipos de virus Influenza (Paterson et al. 2003; Plant and Ye 2013).

El segmento 8 que es el más pequeño del genoma viral de VIB codifica para una proteína no estructural denominada NS1 y para una proteína de exportación nuclear llamada NEP. La proteína NEP es transcripta como producto de un transcrito empalmado y es incorporado a los viriones en un número bajo. Por otro lado, el principal rol de NS1 es modular la respuesta inmune del huésped y tiene un papel destacado en la inhibición de la respuesta interferón celular de tipo I (IFN-I) (Hale et al. 2008). NS1 es una proteína multifuncional que interactúa con varias proteínas del huésped y tiene un dominio de unión al ARN (Plant and Ye 2013).

El genoma segmentado de sentido negativo otorga algunas ventajas y desventajas. Tener el genoma segmentado genera desafíos como el garantizar que cada uno de los segmentos sea empaquetado en el mismo virión. Sin embargo, también ayuda a mitigar el dilema de los virus ARN de poseer una enzima con altas tasas de error. Se ha calculado que para los virus de la influenza estas tasas de mutaciones de la ARN polimerasa ARN dependiente por sitio por ciclo infeccioso son del 2×10^{-6} y $0,6 \times 10^{-6}$ para VIA y VIB respectivamente (Nobusawa and Sato 2006).

Los virus Influenza pueden existir como una cuasiespecie, es decir, como un grupo de variantes virales que comparten una secuencia consenso y que colectivamente contribuyen a las características de la población. Esto permite que las mutaciones existan por sí mismas y puedan tener efectos que aumenten, disminuyan o no produzcan efecto sobre la capacidad replicativa (del inglés “fitness”) de la cuasiespecie. Cuando varios viriones con mutaciones en diferentes segmentos infectan una misma célula, un posible reordenamiento puede generar combinaciones de mutaciones en la nueva progenie que mejore la capacidad replicativa viral (Lauring and Andino 2010).

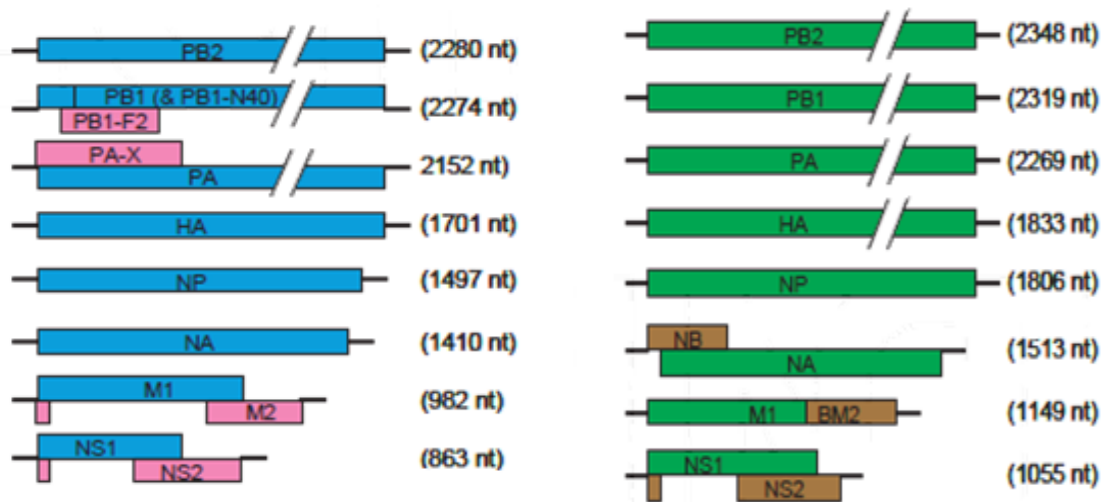


Figura 5. Genoma del virus Influenza A, VIA (a la izquierda) y del virus Influenza B, VIB (a la derecha). A la izquierda, se observa un esquema del genoma de VIA. Las líneas negras al final y al principio de cada uno de los ocho segmentos indican las regiones no codificantes (NCR). Los cuadros azules y rosados representan los principales regiones codificantes de proteínas. A la derecha, se observa un esquema del genoma de VIB. Las líneas negras al final y al principio de cada uno de los ocho segmentos indican las regiones no codificantes (NCR). Los cuadros verdes y marrones representan los principales regiones codificantes de proteínas. Extraído y modificado de (Plant and Ye 2013).

5. Glicosilación de los virus Influenza

La N-glicosilación es una modificación postraduccional común en las glicoproteínas de mamíferos mediante las cuales los oligosacáridos se unen a través de enlaces N-glucosídicos al residuo Asparagina (Asn) del motivo de glicosilación Asn-X-Ser/Thr donde X puede representar cualquier aminoácido excepto Prolina (Pro) (Kornfeld and Kornfeld 1985). Los virus Influenza escapan de los anticuerpos neutralizantes a través de una serie de mecanismos involucrando mutaciones en la HA. El más simple es la disminución de la afinidad de los anticuerpos por sustituciones aminoacídicas en los epítopes (Caton et al. 1982). Con menos frecuencia se dan sustituciones aminoacídicas distantes que tienen efectos alostéricos en el acceso de los anticuerpos a sus epítopes (Yewdell et al. 1993). Sustituciones de aminoácidos en el sitio del receptor de ácido siálico u otras regiones del dominio globular pueden aumentar la afinidad por los receptores celulares permitiendo escapar a los virus de los anticuerpos neutralizantes (Yewdell et al. 1986; Temoltzin-Palacios and Thomas 1994). Las alteraciones más drásticas en la antigenicidad resultan de sustituciones aminoacídicas que crean un sitio de N-glicosilación en el dominio globular, ya que el glicano unido puede bloquear estéricamente la unión de los anticuerpos a múltiples sitios (Skehel et al. 1984; Das et al. 2011; Medina et al. 2013). La N-glicosilación de las

proteínas se superficie HA y NA virales ocurre al igual que las glicoproteínas celulares en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. La naturaleza de los glicanos expresados como los procesamientos que se dan en la HA y la NA están determinados por la célula huésped infectada (Nakamura and Compans 1979; Deom and Schulze 1985; An et al. 2019). Los glicanos expresados por la HA viral carecen de ácido siálico debido a su eliminación por la acción de la NA viral (Basak et al. 1985; Kaverin and Klenk 1999).

La HA es el principal antígeno en la vacuna contra la Influenza estacional debido a su rol en la infección viral. La N-glicosilación ligada a la HA puede afectar la virulencia por modulación de la unión al receptor del virus (de Vries et al. 2010), enmascarando sitios antigénicos (Skehel et al. 1984) y estimulando respuesta inmune del huésped (Wei et al. 2010). El virus de la influenza experimenta cambios de secuencia que son seleccionados bajo presión inmunológica o por adaptaciones en la célula huésped. Los cambios de aminoácidos generados resultan en la ganancia o la pérdida de sitios de glicosilación que alteran las regiones antigénicas de la HA (Cherry et al. 2009). Por lo tanto, de una temporada a otra temporada los cambios antigénicos pueden no solo estar relacionados con la secuencia de proteínas sino también con el patrón de glicosilación de las cepas vacunales. El aumento de la glicosilación de la molécula HA también se ha correlacionado con una disminución de la virulencia, un cambio en el tropismo desde el tracto respiratorio inferior al superior y/o una disminución de las infecciones bacterianas secundarias pulmonares. Esto sugiere que los niveles crecientes de glicosilación podrían aumentar la evasión inmune en presencia de inmunidad adaptativa de la población y también reduce la virulencia o la capacidad de replicación en individuos no inmunes (McCullers 2014; York et al. 2019).

Los oligosacáridos unidos en la región del tallo de la HA viral tienden a conservarse a través de diferentes cepas de virus mientras que aquellos unidos a la cabeza globular muestran una variación considerable tanto en número como en ubicación (Wagner et al. 2000; Abe et al. 2004). La adquisición de modificaciones adicionales de N-glicano en la cabeza globular ha evolucionado como una estrategia de los virus Influenza estacionales para evitar respuestas inmunes humanas (Medina et al. 2013). Sin embargo, mientras que los sitios de N-glicosilación en el dominio de cabeza son variables entre diferentes cepas y diferentes subtipos (Krammer and Palese 2013), los sitios de N-glicosilación en la región del tallo están en su mayoría conservados entre varias cepas de virus de la gripe (Steel et al. 2010).

La hemaglutinina se ensambla como un homotrímero presentando una cabeza globular expuesta a la superficie formado por parte de la subunidad HA1 mientras que la región del tallo está compuesta principalmente de α -hélices enrolladas y de un dominio transmembrana formado por la subunidad HA2. Tanto la región del tallo como el dominio de la cabeza están fuertemente glicosiladas y la fijación de glicano puede afectar a un amplio espectro de las propiedades biológicas de estas proteína y en último término del virus como la inmunogenicidad, la virulencia y la especificidad del receptor (de Vries et al. 2010; Sun et al. 2013). En general, la fijación del glicano en la región del tallo está muy conservada y juega un papel crítico en el correcto plegamiento de proteínas y en el transporte de las mismas hacia la superficie celular (Roberts et al. 1993; Zhang et al. 2015). Por el contrario, la cabeza globular de HA exhibe una tasa de variación considerablemente mayor. Los sitios antigénicos ubicados en el dominio de la cabeza también sufren modificaciones perjudicando el reconocimiento inmune (Medina et al. 2013; Hervé et al. 2015). Además de los cambios de aminoácidos que implica la deriva antigénica, en los virus Influenza a menudo se generan cambios en los patrones de glicosilación de las glicoproteínas de superficie HA y NA o cambios en la exposición de un sitio antigénico particular en dichas

proteínas. Dependiendo de la célula huésped en la cual el virus replica son las modificaciones post-traduccionales que pueden adquirir tanto la HA como la NA (Suzuki 2005).

La capacidad de los virus para explotar estas rutas de escape está limitada por sus costos de la capacidad replicativa viral (del inglés, viral fitness). El sitio de unión al receptor de ácido siálico se encuentra entre los sitios antigénicos inmunodominantes y las sustituciones de escape a menudo alteran la capacidad replicativa viral al cambiar la avidéz de unión al receptor de HA. Las sustituciones de aminoácidos que cambian la carga neta del dominio globular típicamente alteran la avidéz (Underwood et al. 1987; Hensley et al. 2009). Las sustituciones que agregan sitios de N-glicosilación dentro del dominio globular para escapar de la neutralización de anticuerpos a menudo reduce la avidéz del receptor (Das et al. 2011). La avidéz del receptor y la antigenicidad de la HA están vinculadas y deben estar continuamente equilibradas para mantener la capacidad replicativa durante la evolución antigénica (Hensley et al. 2009; Das et al. 2013).

Se observan diferencias en los patrones de N-glicosilación de los dos linajes de VIB. Mientras que algunas posiciones del residuo Asn están glicosiladas en ambos linajes otras no son compartidas por lo que se plantea que las diferencias sutiles en la prevalencia de glicanos ligados en uniones α -2,3 en las células del tracto respiratorio de niños pequeños en comparación con los adultos, combinado con cambios parciales en los patrones de glicosilación, podrían explicar la distribución diferencial de edades observada en los dos linajes de Influenza B (Nicholls et al. 2007; Walther et al. 2013; Vijaykrishna et al. 2015). Desde la divergencia de los dos linajes de VIB, se ha mantenido casi constante el número de sitios de N-glicosilación de la HA de 10 a 12 (York et al. 2019).

Se han descrito 10 sitios potenciales de glicosilación en la glicoproteína HA, siete encontrados en la subunidad HA1 (25, 59, 123, 145, 163, 301 y 330) y tres en la subunidad HA2 (145, 171 y 184) (Wang et al. 2008). Se ha observado que la glicosilación en el residuo 145 de la subunidad HA1, detectada por primera vez en la cepa B/Great Lakes/54, se ha mantenido desde entonces y se especula que la presencia del glicano en esa posición del bucle-150 puede ser ventajosa para los VIB para evadir la respuesta inmune (Wang et al. 2008). En los VIB se ha observado que la pérdida de la glicosilación en la posición 194 en la región de la hélice-190 de la HA se encuentra frecuentemente relacionada con variaciones en dicha posición en mutantes de escape a anticuerpos monoclonales (Berton et al. 1984; Berton and Webster 1985), en variantes adaptadas a huevos (Oxford et al. 1990, 1991; Robertson et al. 1990; Gambaryan et al. 1999; Saito et al. 2004; Ni et al. 2014) y en variantes aisladas en la población (Nakagawa et al. 2000, 2004).

Si bien el papel de la glicosilación en la NA es menos conocido, la N-glicosilación es importante para obtener una proteína funcional (Wagner et al. 2000). En la NA de VIB se han identificado cuatro sitios de N-glicosilación en las posiciones 56, 64, 144 y 284 y para los virus del clado 3 del linaje B/Yamagata se identificó un sitio adicional de N-glicosilación en la posición 463 (Tewawong et al. 2017b). La continua deriva genética del virus Influenza resulta en un acúmulo de mutaciones que pueden introducir nuevos sitios de N-glicosilación y alterar los epítopes antigénicos de la progenie (Krammer et al. 2018). La pérdida o ganancia de glicosilación también puede cambiar los perfiles de especificidad de sustrato y el correcto plegamiento de la molécula afectando por lo tanto la actividad enzimática de la proteína NA. Además, la glicosilación de NA puede cambiar las propiedades antigénicas del virus afectando su patogenicidad. Las tasas de sustitución nucleotídica en el gen de la NA son comparables en varios estudios (Oong et al. 2015; Vijaykrishna et al. 2015; Tewawong et al. 2017b).

6. Hemaglutinina

La Hemaglutinina, HA, es una de las principales glicoproteínas de superficie del virus Influenza debido a que media la entrada del virus a la célula y es uno de los objetivos primarios para los anticuerpos neutralizantes del huésped (Han and Marasco 2011).

Los anticuerpos dirigidos hacia la HA neutralizan la infectividad del virus por lo que las cepas virales evolucionan con cambios frecuentes de aminoácidos en los sitios antigénicos mientras que otras regiones como el dominio de tallo de la molécula de HA permanecen conservadas entre las diferentes cepas y subtipos (Bouvier and Palese 2008).

Se ha determinado la estructura cristalina de la HA de los VIB en varios estados (Wang et al. 2007, 2008; Ni et al. 2013). La estructura cristalina de la molécula de HA es un homotrímero con dos regiones estructuralmente distintas: un tallo que está formado por tres α -hélices superenrolladas y un dominio globular de hojas β antiparalelas que se encuentran colocadas por encima de la región del tallo (Bouvier and Palese 2008). El dominio globular contiene los sitios de unión al receptor (RBS del inglés "receptor binding site") que reconocen los residuos de ácido siálico en la superficie celular (Bouvier and Palese 2008). (Figura 6).

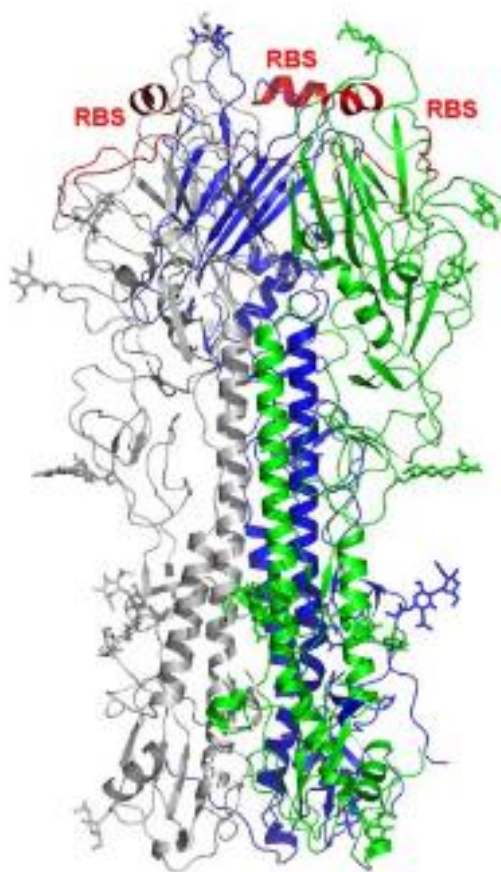


Figura 6. Estructura de la glicoproteína HA de VIB. Representación de la estructura de la molécula de HA de la cepa B/Yamanashi/98. Las tres subunidades que forman el homotrímero se representan en diferentes colores (gris, azul y verde). El sitio de unión al receptor (RBS del inglés "receptor binding site") se resalta en color rojo. Extraído y modificado de (Ni et al. 2013).

El precursor de la HA, HA0, se sintetiza como un único polipéptido que luego es procesado en un péptido señal (que tiene una longitud de 15 aminoácidos) y en dos subunidades que se encuentran unidas por puentes disulfuro: HA1 y HA2 (Copeland et al. 1986; Suzuki and Nei 2002). La modificación postraducciona de la glicoproteína HA es necesaria para la infectividad y la patogenicidad del virus. La subunidad HA1 contiene el sitio de unión al receptor y alberga la mayoría de sitios antigénicos que sufren variaciones constantes (Knossow and Skehel 2006). Por otro lado, la subunidad HA2 es la más conservada y contiene el péptido de fusión en su extremo amino terminal y es responsable de inducir la fusión de la envoltura viral y la membrana endosomal (Varecková et al. 2003).

En todas las regiones donde se esperan rearrreglos estructurales cuando la molécula HA es expuesta a bajo pH, se encuentran clusters de residuos ionizables que están altamente conservados (Wang et al. 2008).

6.1. Sitios antigénicos

Mientras que la superficie de la glicoproteína HA es el objetivo antigénico principal de los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunas, el virus es evolutivamente capaz de cambiar rápidamente sus epítopes vulnerables dentro de esta proteína para evitar su detección y eliminación por parte del sistema inmune (Han and Marasco 2011).

Los virus Influenza tienen dos mecanismos principales de evolución antigénica: “deriva antigénica” y “salto antigénico”. Se produce deriva antigénica cuando el virus acumula mutaciones en los sitios antigénicos durante la replicación a causa de la acción de la enzima ARN polimerasa ARN dependiente que no tiene mecanismo de corrección de errores, esto produce variantes virales que pueden escapar a la inmunidad existente del huésped. El fenómeno de deriva antigénica ocurre tanto en VIA como VIB. A causa de la naturaleza segmentada del genoma de los virus Influenza, se produce un segundo mecanismo de evolución llamado salto antigénico. Este mecanismo ocurre cuando un virus adquiere una nueva HA antigénicamente diferente a través del reordenamiento. Si bien ambos, VIA y VIB se reordenan, el salto antigénico sólo ocurre en VIA debido al reservorio natural que posee y que provee de nuevos genes (Wright PF, Neuman G, Kawaoka Y. 2007).

La determinación de la primera estructura cristalina del ectodominio de HA de la cepa viral B/Hongkong/8/1973 ha permitido mapear su estructura antigénica (Wang et al. 2008). Otros trabajos también han reportado evidencia de estructuras cristalinas de otras cepas virales (Ni et al. 2013). La numeración de los aminoácidos se realiza sin el péptido señal (Suptawiwat et al. 2017). Se han identificado cuatro sitios antigénicos en la membrana distal del dominio globular de la subunidad HA1 de los VIB llamándose a estas regiones bucle-120, bucle-150, bucle-160 y hélice-190 (Nakagawa et al. 2005, 2006; Wang et al. 2008; Shen et al. 2009; Ni et al. 2013). Estos sitios antigénicos fueron identificados por técnicas como escape de mutantes, estudios estructurales y análisis de selección positiva y se ha demostrado que se encuentran bajo presión selectiva positiva; sin embargo, permanecen inciertos los mecanismos por el cual los cambios aminoacídicos producen cambios en las propiedades antigénicas de la HA (Nakagawa et al. 2005, 2006; Lugovtsev et al. 2007; Wang et al. 2007, 2008; Nunes et al. 2008; Shen et al. 2009; Ni et al. 2013). (Figura 7).

El sitio antigénico del bucle-120 comprende los aminoácidos de las posiciones 116 a 137 del bucle así como también los residuos que se encuentran en las regiones de alrededor: 48, 56, 75, 177,

179, 180, 181 (Nakagawa et al. 2001b). El dominio estearasa vestigial (179-181) pertenece al epítotope del bucle-120 (Ni et al. 2013). La región del bucle-120 es uno de los epítotope con más mutaciones encontradas en los aislados y su rol en la antigenicidad de la HA de los VIB no fue reconocido hasta hace más de una década debido a la posición próxima que tiene este epítotope de la membrana viral y que hace dificultoso el acceso de los anticuerpos (Shen et al. 2009). Los residuos 75, 77, 116, 118 y 122 en la subunidad HA1 se encontraron como únicos en cepas de B/Victoria (Nakagawa et al. 2006; Wang et al. 2008). (Figura 7).

El sitio antigénico del bucle-150 contiene los residuos aminoacídicos de las posiciones 141-150 y se ha demostrado por comparación estructural que es equivalente al sitio antigénico A de la HA de los VIA (Nakagawa et al. 2001b). Es un bucle largo que sobresale de la estructura en el cual se ha encontrado frecuentemente sustituciones aminoacídicas que producen cambios en las propiedades antigénicas de la HA (Berton et al. 1984; Hovanec and Air 1984; Berton and Webster 1985; Nakagawa et al. 2003; Abed et al. 2003; Lugovtsev et al. 2007). La región del bucle-150 aparece ser un epítotope neutralizante específico de las cepas del linaje B/Yamagata (Nakagawa et al. 2003). (Figura 7).

El sitio antigénico de la región del bucle-160 está formado por los residuos en las posiciones 162 a 167 de la membrana distal. Se define a esta región como "tip" y es equivalente al sitio antigénico B de la HA de los VIA (Wiley et al. 1981; Berton et al. 1984; Berton and Webster 1985; Nakagawa et al. 2005, 2006). Esta es la única región en la cual frecuentemente se han encontrado inserciones y deleciones (Hovanec and Air 1984; Nerome et al. 1998; McCullers et al. 1999). En esta región se detectaron mutaciones puntuales o sustituciones puntuales de aminoácidos que son específicas para cepas que pertenecen al linaje B/Victoria (Nakagawa et al. 2001b). (Figura 7).

La región de hélice-190 comprende a los aminoácidos en las posiciones 194 a 202 y la región del bucle-240. La región de la hélice-190 se encuentra en el extremo de la membrana de la molécula HA y forma el borde superior e izquierdo de la unión al receptor. Está constantemente bajo una fuerte presión de selección positiva en ambos linajes B/Victoria y B/Yamagata (Wang et al. 2008; Nunes et al. 2008; Shen et al. 2009; Ni et al. 2013). De estudios estructurales, se evidencia que la región 235-240 de la subunidad HA1 sufre grandes reordenamientos estructurales. La presencia de nuevos aminoácidos cambia la orientación de la cadena lateral por lo que se evidencia que la reorientación de las cadenas laterales en esta región podrían cambiar las propiedades antigénicas de la HA (Ni et al. 2013). La estructura de la HA del VIB revela que mutaciones en la región 194-196 provoca que se pierda el sitio de glicosilación en el residuo 194 cuando los virus son crecidos en huevos embrionados y esas modificaciones hacen que la HA tenga mayor afinidad por los residuos de ácido siálico en uniones α -2,3 que son las más abundantes en huevos (Wang et al. 2007). Además, se propone que el residuo en posición 222 como determinante universal para los diferentes modos de unión a los receptores humanos por los diferentes tipos y subtipos de la HA (Wang et al. 2007). La ganancia o pérdida de glicosilación son causantes de generar variaciones antigénicas en esa región (Wang et al. 2008). (Figura 7).

Una de las mayores diferencias en la hélice-190 es la observada en el residuo 206. En la cepa de referencia B/HongKong/8/73 y en las cepas del linaje B/Victoria se encuentra un residuo Lys-206 mientras que en la cepa B/Yamanashi/98 que pertenece al linaje B/Yamagata se encuentra el residuo Asn en esa posición. El residuo Asn-206 forma un fuerte enlace de hidrógeno con el residuo Asn-168 que podría ayudar a estabilizar la estructura de la HA y se necesitan estudios para evaluar el impacto en la patogénesis (Ni et al. 2013).

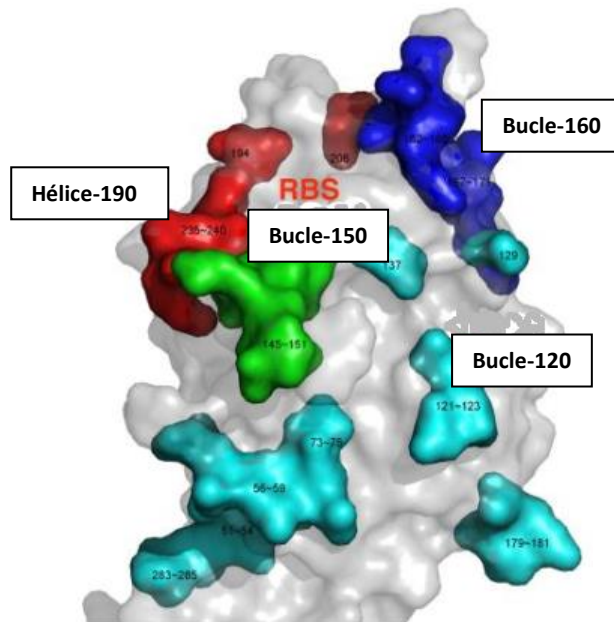


Figura 7. Estructura antigénica del sitio de unión al receptor de la glicoproteína HA de VIB. Presentación superficial del dominio globular de la HA de la cepa B/Yamanashi/98. Se indican los residuos con grandes variaciones estructurales entre B/Yamanashi/98 o B/Brisbane/08 con respecto a la cepa B/HK/73 según sus ubicaciones espaciales en las diferentes regiones antigénicas. La región del bucle-120 está representada en color cian, la región del bucle-150 en color verde, la región del bucle-160 en color azul y la región de la hélice-190 en color rojo. Extraído y modificado de (Ni et al. 2013).

Las mayores variaciones estructurales observadas entre los diferentes HA de los VIB están correlacionadas con frecuentes sustituciones de aminoácidos concentradas en los cuatro epítopes principales. Las estructuras en bucle en los cuatro epítopes hacen posible acomodar fácilmente las sustituciones de aminoácidos en esas regiones, resultando en cambios estructurales que son lo suficientemente grandes como para evadir el reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes, pero también lo suficientemente pequeños como para mantener la integridad estructural de la proteína, particularmente del sitio de unión al receptor para asegurarse la unión a los receptores de la superficie celular de manera eficiente (Ni et al. 2013).

Entre los cuatro epítopes principales de la HA del VIB, las presiones selectivas diferenciales parecen operar tanto en las cepas del linaje B/Victoria como en el de B/Yamagata. El bucle-150 parece estar bajo mayor presión selectiva positiva en el linaje B/Yamagata que en el B/Victoria (Nakagawa et al. 2001a, 2003). El bucle-160 era específico para los aislados del linaje B/Victoria (Nakagawa et al. 2001b, 2005), sin embargo este bucle que solía ser específico está siendo utilizado por el linaje B/Yamagata en los últimos años (Ni et al. 2013). La ubicación espacial cercana que tienen las regiones del bucle-150, del bucle-160 y de la hélice-190 hace que los anticuerpos neutralizantes que reconocen estas regiones compitan entre ellos, sugiriendo que estas regiones podrían formar parte de un gran sitio antigénico continuo (Hovanec and Air 1984; Berton and Webster 1985; Dreyfus et al. 2012).

Por otro lado, la falta de reactividad cruzada entre los anticuerpos neutralizantes que reconocen la región del bucle-120 y los que reconocen el bucle-160/hélice-190 sugiere que el sitio que corresponde al bucle-120 es un sitio antigénico separado (Hovanec and Air 1984; Berton and Webster 1985; Dreyfus et al. 2012).

6.2. Sitio de unión al receptor

La actividad del sitio de receptor de la HA es una de los factores claves de la patogénesis del virus Influenza (Matrosovich et al. 2000; Viswanathan et al. 2010). El sitio de unión al receptor en la HA de los VIB se encuentra localizado en la parte superior del dominio de membrana distal formado por la hélice-190, bucle-140 (136-143 HA1) y el bucle-240. Su base está formada con 4 residuos aminoacídicos que están muy conservados y son Phe-95, Trp-158, His-191 y Tyr-202 (Wang et al. 2007). (Figura 8).

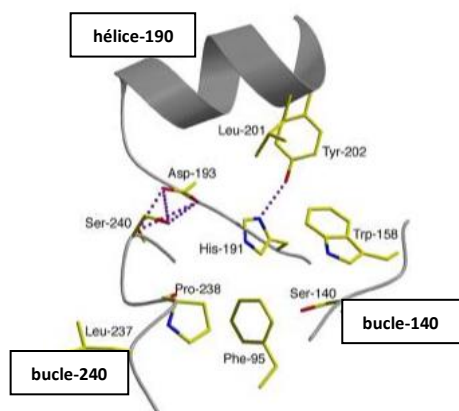


Figura 8. Sitio de unión al receptor de la HA de B/HK. Vista de primer plano del sitio de unión al receptor. Se indican los residuos importantes que forman el sitio de unión al receptor. Con líneas discontinuas se indican las interacciones de enlace de hidrógeno entre ellos. Tomado y modificado de (Wang et al. 2007)

Una característica única del sitio de unión al receptor de la HA de la cepa B/HongKong/8/73 es el presencia del residuo Phe-95 en lugar de Tyr como se encuentra comúnmente en todas las HA de los VIA conocidos (Wang et al. 2007).

7. Neuraminidasa

La NA es un antígeno de superficie que contiene el sitio activo enzimático y que es blanco de los inhibidores de la NA (Sheu et al. 2008). Algunos estudios demostraron que la actividad sialidasa de la NA ayuda a acceder al virus a las células catalizando la escisión de residuos de ácidos siálicos unidos a receptores “señuelos” como por ejemplo las mucinas, cumpliendo un rol en la entrada viral (McAuley et al. 2017). Además, otros experimentos demuestran una disminución en la infección en presencia de fármacos bloqueadores de la NA con lo que proporcionan también evidencia del papel de la NA en las primeras etapas del ciclo viral (Matrosovich et al. 2004; Ohuchi et al. 2006; Su et al. 2009). Por lejos, la función más caracterizada y principal de la NA es su acción como enzima sialidasa, permitiendo la liberación de nueva progenie viral por escisión enzimática de los ácidos siálicos de los receptores de la superficie celular y de cadenas laterales de carbohidratos en viriones nacientes (Palese et al. 1974).

El mecanismo catalítico de la NA aún no ha sido completamente resuelto pero se especula que comienza con la unión del sustrato al sitio activo a través de interacciones con los residuos catalíticos e implica la formación de puentes salinos entre el carboxilato del ácido siálico y los tres grupos de arginina en un extremo del sitio activo (McAuley et al. 2019). Cuando la actividad de la NA es inhibida por el uso de antivirales dirigidos al sitio enzimático o mediante la alteración de

residuos de aminoácidos claves, los viriones emergentes se agregan en la superficie celular en lugar de ser liberados (Tarbet et al. 2014; Yang et al. 2016). Este agrupamiento de viriones se debe a que la nueva HA de los viriones se une a los ácidos siálicos expresados en los receptores de la vecindad del sitio de gemación y a las cadenas laterales de carbohidratos las nuevas glicoproteínas de HA y NA de la progenie viral que todavía contienen ácidos siálicos terminales en ausencia de la actividad de NA (McAuley et al. 2019).

Estudios de la estructura cristalina de la NA demostraron que es un homotetrámero (Burmeister et al. 1992a; Gong et al. 2007), cada monómero se pliega en seis hojas β formado por cuatro dominios que son estructuralmente diferentes: cola citoplasmática, región transmembrana, dominio de tallo y el dominio catalítico globular (McAuley et al. 2019). El sitio activo de esta enzima está ubicado dentro de un bolsillo formado en cada subunidad de la glicoproteína y esa cavidad se encuentra revestida por aminoácidos conservados en todos los tipos de NA de VIA y VIB caracterizados (Colman et al. 1983). El sitio activo de la NA consta de una capa interna de ocho residuos conservados que interactúan directamente con los ácidos siálicos (Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 y Tyr406). Tres residuos de arginina (Arg118, Arg292, Arg371) interactúan con el grupo carboxilato del ácido siálico. La Arg152 se une al grupo acetamido en el anillo de azúcar, mientras que el residuo Glu276 interactúa con los grupos 8 y 9-hidroxilo de la cadena lateral de glicerol (Burnham et al. 2013; McAuley et al. 2019). Además, hay una capa exterior de 10 residuos aminoácidos que no entran en contacto con el ácido siálico pero que cumplen con una función estructural (Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Glu227, Glu277, Asn294 y Glu425). Se dice que el sitio activo de la enzima es altamente conservado tanto en orientación espacial como en propiedades de secuencia, convirtiéndolo en un objetivo ideal para la inhibición de drogas (McAuley et al. 2019). (Figura 9).

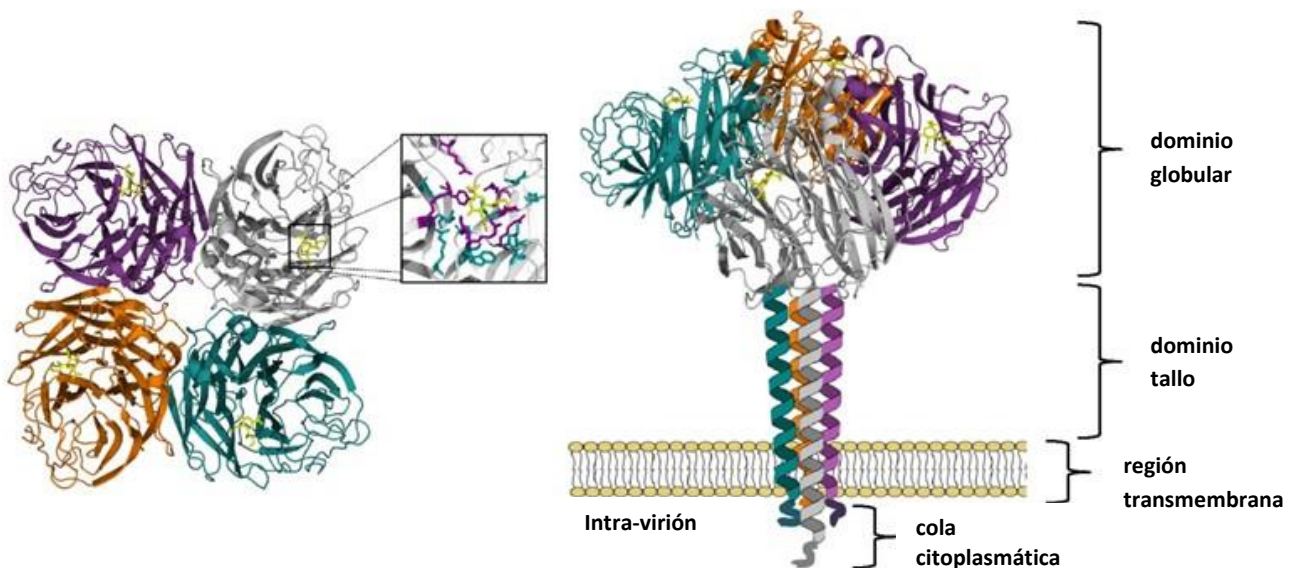


Figura 9. Estructura de la glicoproteína NA y de su sitio catalítico. A la derecha, se representa el dominio globular catalítico de la NA. Cada uno de los cuatro monómeros se representa en un color diferente. En amarillo se encuentra destacado el ácido en cada uno de los monómeros. En la región ampliada se muestra la estructura en bolsillo que tiene forma de bolsillo y el cual toma contacto con el ácido siálico. A la izquierda, se representa la NA que es un tetrámero formado por cuatro monómeros idénticos. Cada monómero, representado en un color diferente, consta de cuatro dominios estructurales distintos conocidos como dominio globular donde se encuentra el sitio catalítico, el dominio de tallo, la región transmembrana y la cola citoplasmática. En amarillo se destaca el residuo de ácido siálico en cada monómero globular. No

se definido en el esquema la estructura del dominio de tallo de NA, de la región transmembrana y de la cola citoplasmática por lo que se representan como cuatro hélices alfa. Tomado y modificado de (McAuley et al. 2019).

8. Ecología

Una diferencia notable entre ambos tipos de Influenza es la tasa de evolución y ecología. Los VIA evolucionan rápidamente y están caracterizados por una amplia gama de hospedadores, se mantienen como reservorio en aves acuáticas y pueden ser aislados de una gran variedad de animales incluido los humanos. Influenza B infecta principalmente a humanos y evolucionan a un ritmo más lento, probablemente debido a falta de reservorio de animales salvajes (Nobusawa and Sato 2006; Chen and Holmes 2008). Algunos reportes han aislado y demostrado que las focas son huéspedes sensibles a la infección por VIB pero su papel en la transmisión o como fuente de diversidad es desconocida (Osterhaus et al. 2000; Ohishi et al. 2002; Blanc et al. 2009; Bodewes et al. 2013). Por otro lado, se ha demostrado que los cerdos domésticos son susceptibles a la infección por VIB. Los resultados de ese estudio demuestran el VIB es un patógeno porcino y que los cerdos podrían servir como reservorio natural y como modelo para estudiar los mecanismos de transmisión y patogénesis de estos virus (Ran et al. 2015).

9. Manifestaciones clínicas de la infección causada por el VIB y epidemiología

Estudios clínicos sugirieron que los síntomas de mialgia, dolor de garganta y ronquera se asocian con mayor frecuencia a infecciones con VIB que con VIA pero también a veces son clínicamente indistinguibles (Paul Glezen et al. 2013). Algunos informes sugieren que VIB fue más común que VIA en niños con tumores malignos u otras condiciones de inmunosupresión (Peltola et al. 2003, 2011; Carr et al. 2011). Otros estudios destacan la presencia de síntomas gastrointestinales asociados a infecciones con VIB (Peltola et al. 2003; Wright 2006). Sin embargo, no está claro si todos estos síntomas se atribuyen a la patogenicidad del virus o si es porque esta infección es más predominante y común en niños y adultos jóvenes.

Las complicaciones de Influenza B son poco estudiadas y la mayoría de los informes disponibles a la fecha, son en referencia a pacientes individuales con múltiples complicaciones en su mayoría niños y con estados inmunodeprimidos (Aebi et al. 2010; Chen et al. 2011; Namendys-Silva et al. 2011). Se han descrito complicaciones pulmonares como la neumonía viral primaria, neumonía secundaria bacteriana o fúngica, neumonía combinada viral-bacteriana y exacerbaciones de enfermedades pulmonares (Krell et al. 2003; Yusuf et al. 2007; Wang et al. 2009; Aebi et al. 2010; Chen et al. 2011; Paddock et al. 2012; Gutiérrez-Pizarra et al. 2012; Horthongkham et al. 2016). Es importante destacar, que en un estudio se encontró evidencia histológica de neumonía intersticial en caso fatal durante las infecciones por el VIB y también encontraron que las superinfecciones bacterianas eran más comunes en pacientes mayores de 18 años (Paddock et al. 2012). Varios informes de pacientes individuales con infección con VIB reportaron complicaciones como el síndrome de dificultad respiratoria aguda (Lu et al. 2004; Wang et al. 2009; Namendys-Silva et al. 2011; Cardoso et al. 2012). Las complicaciones en infecciones con VIB son lesiones miocárdicas que se observan en casi el 70% de los casos fatales (Paddock et al. 2012) como también se observa la afectación del sistema nervioso central, como por ejemplo encefalitis viral y otras complicaciones como ser síntomas gastrointestinales o miositis (Newland et al. 2003; Tabbutt et al. 2004; Wright 2006; Muneuchi et al. 2009; Frank et al. 2010). Es necesario diseñar estudios adicionales específicos para las poblaciones infectadas con el virus de la Influenza B para estimar adecuadamente la implicancia de las complicaciones.

Aunque los individuos desarrollan inmunidad duradera a cepas particulares de Influenza luego de una infección, las mutaciones que experimenta el genoma del virus da como resultado proteínas que van a ser reconocidas en menor grado por el sistema inmune, dejando a las personas susceptibles a futuras infecciones. La deriva antigénica es una de las causas por la cual la eficacia de las formulaciones vacunales va disminuyendo con el tiempo (Bedford et al. 2014).

Los virus B/Victoria se transmiten más fácilmente en humanos que los virus B/Yamagata. B/Victoria tiende a infectar a pacientes más jóvenes comparados con el otro linaje y se piensa que se debe a diferencias en las moléculas que ayudan a los virus a ingresar a las células del tracto respiratorio. Mientras que la co-circulación de virus B/Yamagata puede confundir la selección precisa de las cepas vacunales, los análisis indican también que el linaje B/Yamagata está bajo una presión de selección positiva y una deriva antigénica más débil y en promedio infectan personas de mayor edad. Como consecuencia, hay una mayor posibilidad de que, dado una suficiente cobertura vacunal, los virus B/Yamagata puedan experimentar una caída importante en la prevalencia a lo largo del tiempo a través de métodos de control, como el uso extensivo de vacunas cuatrivalentes, en contraste con los virus B/Victoria más adaptables (Vijaykrishna et al. 2015).

La frecuencia de los casos confirmados por laboratorio, la carga clínica en diferentes grupos de la población, las complicaciones asociadas y las tasas de hospitalizaciones han sido menos estudiadas en pacientes infectados con VIB que con el VIA. Como resultado, su epidemiología y el impacto en la salud pública es menos entendida y con frecuencia subestimada (Burnham et al. 2013). Según reportes de vigilancia, tanto en el hemisferio norte como en el hemisferio sur, la frecuencia reportada de casos positivos para Influenza B es muy variable dependiendo de la temporada y se detectan menos cepas circulantes que VIA (Burnham et al. 2013). Los estudios de vigilancia sugieren que las tasas de infección con VIB son más altas y con infecciones más graves en poblaciones con una inmunidad menos robusta como ocurre en niños, en adultos mayores y en pacientes con enfermedades crónicas. En los adultos mayores se cree que el envejecimiento del sistema inmunitario perjudica la capacidad de controlar las infecciones mientras que en los niños se debería por tener sistemas inmunitarios inmaduros (Thompson et al. 2004; Nair et al. 2011; Reber et al. 2012). La tasa de hospitalización primaria asociada con los casos positivos de VIB es similar al de VIA estacional (H1N1 y H3N2) (Thompson et al. 2003). Sin embargo, en un estudio retrospectivo en EEUU se observaron 45 infecciones fatales por el VIB con una progresión clínica rápida y un tiempo promedio desde el inicio de la enfermedad a la muerte de 3 días. Estos tiempos son más cortos que el promedio de muerte para VIA observado durante las pandemias de 1918, 1957, 1968 y 2009 como también para las infecciones estacionales causadas por el virus H3N2 (Paddock et al. 2012).

La diferencia en la dinámica epidemiológica entre los VIA y VIB también está reflejada en sus tasas de evolución y presiones de selección. Los patrones y procesos de cambios evolutivos en los virus Influenza no solo están determinados por la naturaleza de su interacción con el sistema inmune del humano sino que también reflejan cómo estos virus interactúan entre sí (Chen and Holmes 2008). La recurrencia anual de las epidemias estacionales se atribuye a la continua evolución de los virus Influenza estacionales que les permite escapar de la inmunidad que es inducida por infecciones previas o por la vacunación y por otro lado a la capacidad de estos virus de transmitirse eficientemente entre humanos a través de gotitas respiratorias, contacto directo y fómites (Petrova and Russell 2018).

Se observan diferencias en las filogenias del gen HA en ambos linajes. El linaje B/Victoria se caracteriza por un único árbol con un tronco prominente con ramas laterales que circulaban por pocos períodos de tiempo, de 1 a 3 años; este patrón evolutivo también es observado en los virus H3N2 y es indicativo de frecuentes cuellos de botella que llevan al reemplazo de las cepas circulantes. En contraste, para el linaje B/Yamagata se observa una mayor diversificación con múltiples clados que co-circulan por largos períodos de tiempo. La construcción de mapas antigénicos utilizando ensayos de inhibición de la hemaglutinación revelaron que los virus del linaje B/Victoria exhibían una variación antigénica que se agrupaba de acuerdo con el año de aislamiento y a la distancia filogenética que también era observada en los virus del subtipo H3N2 de VIA y esto indica un continuo proceso de deriva antigénica. En contraste, las distancias antigénicas para los virus B/Yamagata no tenían correlación con el tiempo o con la distancia filogenética y mostró mayores niveles de reactividad antigénica cruzada entre antisueros de virus que circularon hace muchos años y los más recientes (Vijaykrishna et al. 2015).

Una consecuencia directa de la deriva antigénica es la posibilidad de que individuos previamente infectados puedan reinfectarse. Tasas más altas de deriva antigénica en el linaje B/Victoria deberían conducir a una distribución más equitativa de los casos por edad, mientras que las tasas más bajas de deriva antigénica deberían conducir a una distribución sesgada hacia individuos más jóvenes. Aunque la infección con los virus del linaje B/Victoria tienen una fuerte inclinación hacia los niños va en contra de esta expectativa. La incapacidad de los virus B/Victoria para infectar una proporción equivalente de otros grupos etarios puede ser debida a que la población con más edad esté mejor protegida contra este linaje debido a una respuesta inmune más amplia. El patrón filodinámico del gen HA del linaje B/Victoria se encuentra bajo una mayor presión de selección que escapa a la inmunidad del hospedero mediante la acumulación de sustituciones aminoacídicas beneficiosas para dicho gen. Tal patrón evolutivo asegura que haya un suministro constante de individuos susceptibles a los virus del linaje B/Victoria, tanto naive como reinfectados. En contraste, los patrones filodinámicos exhibidos por los virus B/Yamagata son indicativos de una población viral con una dinámica más lenta y menos periódica, sugiriendo que estos virus están bajo una presión de selección inmune más débil y en consecuencia experimentan una deriva antigénica más débil. (Vijaykrishna et al. 2015).

Ensayos clínicos de vacunación contra el VIB en niños (Skowronski et al. 2011) y en ratones (Skowronski et al. 2012) demostraron que los antígenos B/Yamagata producen una respuesta inmune más fuerte que los antígenos B/Victoria. Si la infección natural con VIB fuese similar, esto implicaría que los virus B/Yamagata son menos capaces de evolucionar a través de la deriva antigénica y por lo tanto escapar de la respuesta inmune (Grenfell et al. 2004). En promedio, los virus del linaje B/Victoria infectan a la población más joven en comparación con el linaje B/Yamagata. Aunque la proporción de casos en la franja de menores de 6 años fue similar para ambos linajes pero con más casos para el linaje B/Victoria (Vijaykrishna et al. 2015). La mayoría de los virus del linaje B/Victoria aislados de varios estudios se identificaron en niños menores a 18 años mientras que el linaje B/Yamagata exhibe una distribución bimodal de edades con una significativa predominancia hacia infecciones en individuos mayores de 25 años (Tan et al. 2013; Sočan et al. 2014; Vijaykrishna et al. 2015).

Se propone que las diferencias en la dinámica evolutiva y epidemiológica son impulsadas por las diferencias en las preferencias de unión de la HA. Como se mencionó anteriormente, los virus B/Victoria prefieren uniones α -2,3 o α -2,6 al ácido siálico mientras que los virus B/Yamagata se

unen predominantemente a glicanos ligados en uniones α -2,6 (Vijaykrishna et al. 2015). Estudios experimentales demostraron que niños hasta 7 años de edad tenían principalmente receptores en uniones α -2,3 con bajo nivel de uniones α -2,6 en comparación con los adultos, estas diferencias entre los diferentes grupos de edad pueden en parte explicar la distribución por edades de ambos linajes de VIB (Nicholls et al. 2007).

10. Estacionalidad

El advenimiento de la vigilancia global del virus Influenza y la secuenciación completa del genoma ha demostrado que los brotes estacionales de cada tipo de Influenza son causados por la introducción estocástica de múltiples linajes virales (Rambaut et al. 2008; Nelson et al. 2008).

Se desconocen las razones por las cuales surgen las epidemias de Influenza alcanzando un pico máximo a intervalos constantes de 6 meses, este patrón es observado tanto en las regiones templadas del hemisferio norte como en las del hemisferio sur. Varias hipótesis se han propuesto para intentar explicar cómo los cambios estacionales podrían estimular la actividad del virus Influenza; por ejemplo las tasas de transmisión podrían aumentar durante los períodos escolares y el hacinamiento invernal, la estabilidad del virus podría mejorar con temperaturas más frías o que la inmunidad del hospedero podría disminuir durante el clima más frío, sin embargo todas estas hipótesis permanecen sin ser comprobadas (Dowell 2001; Tamerius et al. 2011). Se ha propuesto también que una deficiencia de vitamina D durante los meses de invierno podría reducir la efectividad del sistema inmune innato colaborando de esa forma a la estacionalidad de la gripe (Cannell et al. 2006). Por otro lado, investigaciones en regiones tropicales también han mostrado una carga significativa de la enfermedad en áreas con climas cálidos y húmedos, por lo que la temperatura más fría no explicaría por sí sola la estacionalidad de la gripe (Chiu et al. 2002; Wong et al. 2006) o una mejor transmisión de gotitas respiratorias con virus en ambientes con temperaturas y humedad relativa más baja (Lowen et al. 2007).

La actividad del virus Influenza alcanza su punto máximo en momentos similares en países con latitudes similares, la mayoría de las infecciones ocurren durante los meses de invierno en las regiones templadas. En los países que están más cerca del Ecuador, la actividad del virus Influenza es más constante durante todo el año con fluctuaciones epidémicas durante las épocas lluviosas, lo que indica que estas áreas podrían servir potencialmente como reservorios del virus durante todo el año (Viboud et al. 2006; Nelson and Holmes 2007; Tamerius et al. 2011). Otros trabajos han sugerido que la persistencia global en la población de los virus Influenza podría estar impulsada por el pasaje de una epidemia a otra dentro de la población (Bedford et al. 2010; Bahl et al. 2011) o por la existencia de una metapoblación circulante en el este y sudeste de Asia de donde continuamente pueden emerger nuevos virus y migrar al resto del mundo (Russell et al. 2008; Bedford et al. 2015). Las diferencias en la dinámica global de los virus Influenza estacionales probablemente son el resultado de diferencias en las tasas de evolución del virus lo que puede conducir a las variaciones observadas en las distribuciones de infección por edad, es decir, virus que evolucionan rápidamente para escapar de la inmunidad pueden infectar a personas de todas las edades con más frecuencia que los virus que evolucionan a un ritmo más lento y que infecta principalmente a los niños y solo infectan esporádicamente a adultos (Bedford et al. 2015). Los virus del linaje B/Yamagata han sido asociados más frecuentemente a personas de edad avanzada (Tan et al. 2013; Oong et al. 2015; Vijaykrishna et al. 2015). Combinado con una mayor frecuencia de viajes aéreos en adultos que en niños pequeños, este comportamiento humano también está reflejado en la dinámica de los virus Influenza en donde el linaje B/Yamagata con más frecuencia se los asocia a los adultos (Bedford et al. 2015).

Similar a lo que ocurre en el hospedador y en los procesos de transmisión entre individuos, la dinámica epidemiológica a mayor escala también impone fuertes “cuellos de botella” en la evolución de los virus Influenza. La naturaleza estacional, la corta duración de las epidemias de virus, combinadas con la gran diversidad viral en una epidemia en curso se traducen en nuevas variantes emergentes. Sin embargo, incluso cuando estas formas emergentes fuesen de mayor capacidad replicativa que las variantes dominantes tienen poco tiempo para competir con las existentes como para poder replicar a niveles más altos y diseminarse (Petrova and Russell 2018).

11. Evolución

La divergencia de los genes de HA y NA de los VIA y VIB ocurrió antes que la divergencia de los subtipos de NA y HA de los VIA respectivamente (Suzuki and Nei 2002; Xu et al. 2012). Análisis demuestran que todos los segmentos génicos de VIB experimentan los mismos patrones de dinámica evolutiva (Vijaykrishna et al. 2015).

A pesar de la importancia de los VIB para la salud pública, las características de su epidemiología y su dinámica global evolutiva y antigénica son poco conocidas en comparación con los VIA (Tan et al. 2013; Koutsakos et al. 2016). No se ha establecido un patrón evolutivo debido a que en algunos años son predominantes en los aislados mientras que en otros están casi ausentes en la circulación poblacional (McCullers et al. 1999). Conocimientos existentes sobre la dinámica evolutiva de los VIB muestran que experimentan una evolución antigénica más lenta comparado con VIA (Bedford et al. 2014, 2015), con cambios genéticos que incluyen inserciones y deleciones de nucleótidos y eventos frecuentes de reordenamiento de segmentos entre y dentro los linajes que contribuyen a su continua diversificación (Nerome et al. 1998; McCullers et al. 1999; Chen and Holmes 2008; Dudas et al. 2015; Langat et al. 2017).

La evolución de los VIB también se caracteriza por una co-circulación y por un recambio continuo de los dos linajes antigénicamente diferentes (Chen et al. 2007b). Cada grupo antigénico es, por lo general, dominante en forma transitoria y existe por un corto período de tiempo antes de ser reemplazada por un nuevo grupo de virus. Los cambios evolutivos dentro y entre los linajes B/Victoria y B/Yamagata son resultados de cambios en la “inmunidad de rebaño” con reordenamientos que generan continuamente nuevas variaciones genéticas. Además, se sugiere que la interacción con el VIA puede ser central en la configuración de la dinámica evolutiva de los VIB y que faciliten por lo tanto el cambio en la dominancia o co-dominancia de los linajes de éste virus (Chen and Holmes 2008).

Se han propuesto múltiples hipótesis de por qué los VIB evolucionan a un ritmo más lento que los VIA, incluidas que la ARN polimerasa dependiente de ARN de VIB sea menos propensa a los errores que la de VIA, menor inmunogenicidad que los VIA y una afección de unión al receptor relativamente más baja en comparación con VIA. Del mismo modo, a nivel de población las epidemias son menos frecuentes y de menor magnitud por lo que se dan menos oportunidades para que los virus evolucionen sumado a que en la población de niños existe una menor presión de selección evolutiva sobre el virus debido a un menor historial de exposición en comparación con los adultos (Petrova and Russell 2018).

Tanto VIA y VIB evolucionan antigénicamente a través del tiempo en un proceso conocido como deriva antigénica, en el que las mutaciones en la HA permiten que los virus escapen de la inmunidad existente y persistan en la población humana, ocasionando recurrentes epidemias estacionales (Hay et al. 2001; Bedford et al. 2014). La continua presión inmune del hospedero

luego de la infección sumado a la baja fidelidad de la ARN polimerasa puede conducir a una deriva antigénica (Treanor 2004). La mutación genética es considerada uno de los mecanismos moleculares más importantes en la evolución del virus Influenza (Webster and Bean 1978). Al igual que la mayoría de los virus de ARN, el virus Influenza tiene una síntesis de ARN de baja fidelidad lo que resulta en una alta tasa de mutación, alrededor de una mutación por genoma por ciclo replicativo, esto es varios órdenes de magnitud mayor que la de la mayoría de los virus con genoma ADN (Drake 1993; Sanjuán and Domingo-Calap 2016). Fuerzas evolutivas como la selección natural que actúa rápidamente sobre las poblaciones virales mutantes podrían dar forma a la estructura genética de virus Influenza en diferentes huéspedes.

11.1. Linajes del virus Influenza B

El VIB fue aislado por primera vez en 1940 de un paciente pediátrico y designado como B/Lee/40 basado en la falta de reactividad al suero de hurón infectado con la cepa A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (Francis 1940; Sharp et al. 1943). Influenza B divergió en el año 1983 en dos linajes genética y antigénicamente diferentes llamados B/Victoria y B/Yamagata de acuerdo a los lugares donde fueron aislados por primera vez. El linaje B/Victoria está representado por la cepa de referencia B/Victoria/2/87 y el linaje B/Yamagata por la cepa de referencia B/Yamagata/16/88 (Rota et al. 1990; Kanegae et al. 1990; Shaw et al. 2002).

Las cepas del grupo B/Victoria fueron dominantes en la década del 80 mientras que las del grupo B/Yamagata lo fueron durante 1990 (Yamashita et al. 1988; Rota et al. 1990; Kanegae et al. 1990; Nerome et al. 1998; Lindstrom et al. 1999; McCullers et al. 1999; Lin et al. 2004). Desde su detección las cepas del linaje B/Yamagata han estado en continua circulación a diferencia del linaje B/Victoria. Las cepas de B/Victoria fueron nuevamente detectadas circulando en Asia a partir del año 1997 y desde el año 2001 en el resto del mundo (Shaw et al. 2002).

Los linajes de B/Victoria y B/Yamagata pueden ser divididos en sublinajes que pueden cocircular y cambiar en el tiempo (Bedford et al. 2014; Vijaykrishna et al. 2015), resultando en un patrón de evolución diferente para los VIB (Yamashita et al. 1988). Análisis demuestran que los virus de los linajes B/Victoria y B/Yamagata muestran diferencias en sus evoluciones antigénicas. La mayoría de las sustituciones que se dan en el tronco de la filogenia del gen HA de VIB también aparecen en la región globular de dicha molécula. Mientras que los virus del linaje B/Victoria experimentan deriva antigénica y recambio de virus antigénicamente distintos, la bifurcación genética y antigénica de los virus del linaje de B/Yamagata ha permitido que estos virus alternen entre dos subclados a lo largo del tiempo (Bedford et al. 2011; Langat et al. 2017).

A partir del 2008 y basado en las secuencias de los genes de HA, la mayoría de los virus del linaje B/Victoria pertenecen al clado 1A agrupándose en los árboles filogenéticos con la cepa B/Brisbane/60/2008 (Byarugaba et al. 2013). Por otro lado, desde el 2007 la mayoría de los virus que pertenecen al linaje B/Yamagata se distribuyen en dos grupos: el clado 2 representado por la cepa B/Massachusetts/02/2012 y el clado 3 representado por las cepas B/Wisconsin/01/2010 y B/Phuket/3073/2013 (WHO 2013; WHO, 2016). Para el linaje B/Yamagata se han identificado 3 clados diferentes, en la actualidad en Uruguay circula el clado 3 que está representado por las cepas B/Wisconsin/01/2010 y B/Phuket/3073/2013, anteriormente fue detectado el clado 2 representado por la cepa B/Massachusetts/02/2012. Para el linaje B/Victoria están identificados 6 clados diferentes circulando en la actualidad en Uruguay el clado 1A (McCauley J et al. 2016) y el subclado 1A1 (WHO 2016).

Alrededor del 2005 surgieron dos clados genéticamente distintos del linaje B/Victoria llamados 1A y 1B reemplazando al linaje circulante y dominando posteriormente a la población de ese linaje. Si bien los genes de HA de estos clados del linaje B/Victoria son claramente diferentes, el mapeo antigénico demostró que no son antigénicamente distintos (Langat et al. 2017). La diversidad de las secuencias genéticas de las variantes B/Victoria fluctúa entre temporadas y se observa que una variante genética en particular persiste en la población de 1 a 3 años. Esto indica que los virus B/Victoria están bajo mucha presión para evolucionar dando como resultado los llamados "cuellos de botella" en los que sólo los virus que transportan variedades particulares de secuencia genética sobreviven. Este patrón fluctuante se asemeja al observado en la cepa H3N2 de VIA (Vijaykrishna et al. 2015).

Los virus del linaje B/Yamagata se han diversificado en mayor medida y las diferentes variedades del virus tienden a circular juntas durante largos períodos de tiempo (Vijaykrishna et al. 2015). La emergencia y la co-existencia de los dos clados del linaje B/Yamagata en una región han tenido implicancias en la dinámica epidemiológica de VIB. Este cambio en los patrones de dominación apoya la idea de que esencialmente co-circulan tres 'linajes' del VIB con distintos genotipos y antigenidades. En consecuencia, la persistencia de dos clados de linaje B/Yamagata podría tener complicaciones para la vacuna estacional. Sin embargo, a pesar de la divergencia y el mantenimiento cíclico de los clados de este linaje a lo largo de 10 años, informes recientes indican que la incidencia del clado 2 de B/Yamagata ha disminuido sustancialmente (Langat et al. 2017).

Las filogenias de los genes HA y NA pueden ser agrupadas en linajes, clados y subclados; sin embargo esta clasificación no se extiende a otros segmentos del genoma de VIB (Oong et al. 2015). Cada clado domina o co-domina la población viral durante un período particular de tiempo (Chen and Holmes 2008). Se ha demostrado que los genes PB1, PB2 y HA de los virus del linaje B/Victoria y B/Yamagata permanecen como linajes separados a pesar de las altas tasas de reordenamiento observadas (Dudas et al. 2015; Kim et al. 2016). La evidencia sugiere que mantener un linaje "puro" de los segmentos PB1, PB2 y HA es importante para mantener la integridad del genoma completo de VIB y que este patrón observado se debe a la acción de la selección y no simplemente a un patrón de reordenamiento raro (Dudas et al. 2015).

Los virus del linaje B/Victoria tienden a experimentar un recambio de linaje y una deriva antigénica más rápidos (Vijaykrishna et al. 2015) y persisten por más tiempo en las regiones geográficas locales antes de observarse una dispersión global más amplia (Bedford et al. 2015). Mientras que estudios evolutivos revelan que la diversidad del linaje B/Yamagata resulta de la co-circulación de dos sub-clados que son antigénicamente distintos, que divergen genéticamente en todo el genoma y que no hay evidencia de eventos de reordenamientos intralinaje. Las diferencias entre los linajes se reflejan en su dinámica antigénica, los virus del linaje de B/Yamagata muestran dominancia alterna entre grupos antigénicos mientras que los virus del linaje B/Victoria muestran deriva antigénica de un solo linaje (Langat et al. 2017).

En estudios filodinámicos realizados en Australia y Nueva Zelanda se observó que el linaje B/Victoria experimentó fuertes fluctuaciones estacionales en la diversidad genética relativa en contraste con el linaje B/Yamagata (Vijaykrishna et al. 2015). Mientras que la diversidad genética relativa casi invariante del linaje B/Yamagata fue similar a la variación en diversidad de los virus H1N1 estacionales, los cambios en la diversidad en el linaje B/Victoria fueron similares a los observados en los virus H3N2, aunque estos últimos virus exhibieron una mayor frecuencia de oscilaciones que las estimadas para B/Victoria. Las fuertes fluctuaciones estacionales en la

diversidad observadas para el linaje Victoria sugieren que este linaje experimenta fuertes “cuellos de botella” entre temporadas similares a lo descrito para el virus H3N2 (Bedford et al. 2011; Zinder et al. 2013), mientras que el genético relativo casi invariable del linaje B/Yamagata sugiere la co-circulación continua de múltiples linajes (Vijaykrishna et al. 2015).

Análisis genéticos poblacionales consistentes con datos epidemiológicos sugieren que los subtipos H3N2 y H1N1 de VIA compiten entre sí resultando en el dominio de un solo subtipo durante una epidemia. Sin embargo, no está claro si los mismos patrones dinámicos se pueden extender a VIB o por qué los linajes B/Victoria y B/Yamagata han co-circulado por largos períodos de tiempo (Rambaut et al. 2008; Goldstein et al. 2011).

Los patrones de circulación global de H1N1 y los VIB difieren sustancialmente del H3N2. Mientras que las variantes genéticas de estos últimos virus no persisten localmente entre epidemias y emergen nuevamente del este y sudeste de Asia, las variantes genéticas de H1N1 y de los dos linajes del VIB persisten durante varias estaciones y exhiben complejos patrones de dinámica. Los movimientos menos frecuentes a nivel global del subtipo H1N1 y de ambos linajes del VIB coinciden con las tasas más lentas de evolución, infecciones a grupos etarios de corta edad y a epidemias más pequeñas y menos frecuentes que las provocadas por los virus del subtipo H3N2. Modelos epidémicos respaldan que las diferencias en la edad de infección, combinado con los viajes menos frecuentes de niños son probablemente impulsores de las diferencias en los patrones de circulación global, sugiriendo una interacción compleja entre la evolución del virus, la epidemiología y comportamiento humano (Bedford et al. 2015).

La dinámica evolutiva competitiva de los virus Influenza de los tipos A/H3N2, A/H1N1 y de los dos linajes de VIB demuestra que la evolución antigénica dentro de cada grupo impulsa el reemplazo de las cepas circulantes y contribuye a los patrones estacionales. El tipo H3N2 evoluciona más rápido y con mayores cambios en la deriva antigénica que H1N1 y estos dos a su vez evolucionan más rápido que ambos linajes de VIB (Bedford et al. 2014). Los árboles filogenéticos de H3N2 son más delgados y en forma de “escalera” lo que demuestra una rápida rotación de la población viral y la presencia de selección mientras que los árboles de H1N1 y de VIB muestran mayores grados de coexistencia viral. Estos tipos de árboles también podrían reflejar “cuellos de botella” secuenciales que podrían ocurrir con una rápida diseminación espacial (Volz et al. 2013; Bedford et al. 2014). Los cuellos de botella poblacionales en el VIB siempre están asociados con una alta prevalencia del VIA. Como estos dos virus compiten claramente para llenar el mismo nicho, es probable que la infección por un tipo de virus inhiba la infección o la replicación del otro. Por lo tanto, cuando hay una epidemia amplia y duradera de VIA, los VIB necesariamente sufrirán un importante cuello de botella en la población. También se observa que los cambios en el grupo antigénico dominante del VIB siempre ocurren durante o inmediatamente después de un cuello de botella en la población o en años en que la prevalencia es muy reducida. Estos datos demuestran que parece haber una relación entre la prevalencia en la población y el patrón de evolución viral (Chen and Holmes 2008).

11.2. Patogenicidad

Se ha demostrado que los VIB tienen afinidades de unión al receptor más bajas que los VIA (Matrosovich et al. 1993). Los VIB tienen un residuo de Fenilalanina (Phe del inglés Phenylalanine) en posición 95 en contraste al residuo de Tirosina (Tyr del inglés Tyrosine) en posición 98 que tienen los VIA. La Tyr en posición 98 de los VIA permite que el grupo hidroxilo de la cadena lateral forme un enlace de hidrógeno con el residuo Histidina (His del inglés Histidine)

en posición 183 lo que estabiliza la base del sitio de unión al receptor junto con otros dos enlaces de hidrógeno. La ausencia del grupo hidroxilo en la cadena lateral de la Tyr en posición 95 de los VIB provoca la pérdida de los tres enlaces de hidrógeno que estabilizan la unión de la HA con su receptor en los VIA y esto proporciona una explicación plausible de la baja afinidad de los VIB. Resumidos en (Ni et al. 2014).

Se cree que la falta de reservorio de los VIB fuera de la población humana es una de las principales razones por la cual estos virus no utilizan el salto antigénico como método evolutivo. Sin embargo, sigue sin ser demostrada la existencia de una correlación entre el rango limitado de hospedadores y una menor afinidad de unión al receptor de HA en estos virus. Resumido en (Ni et al. 2014).

11.3. Balance HA:NA

Es importante que la actividad de las dos principales glicoproteínas de superficie estén equilibradas para mantener en forma eficiente la capacidad de infección y la liberación de las partículas virales (McAuley et al. 2019). La evolución de una HA o NA que impacta negativamente en la adsorción viral, en la replicación y en la transmisión dan como resultado un virus con menor capacidad replicativa (del inglés “fitness”). Para poder sobrevivir se necesitan mutaciones compensatorias para restaurar su capacidad replicativa (Lin et al. 2010; Mohr et al. 2015).

Para obtener un acceso eficiente a la superficie celular *in vivo* se necesita tener una combinación de actividades de HA y NA que permita el escape de la inhibición de la mucosa ya sea con una HA con baja afinidad por el ácido siálico en uniones α 2-3 o con una NA con mayor actividad hacia el ácido siálico en uniones α 2-3 o una combinación de ambos. Para adsorberse en la superficie celular, la afinidad de la HA por el ácido siálico en uniones α 2-6 debe ser lo suficientemente fuerte como para permitir la unión antes que la NA escinda los receptores. Sin embargo, la unión de la HA no puede ser demasiado fuerte para la liberación de la progenie y para evitar la agregación de los viriones en la superficie celular dando acceso a la NA para escindir el ácido siálico en uniones α 2-6 (McAuley et al. 2019).

La afinidad de la HA y de la NA y la cinética de interacción con los ácidos siálicos son los principales determinantes de la capacidad del virión para infectar una célula. En promedio, un virión tiene entre 300 y 400 espículas de HA y entre 40 y 50 espículas de NA (Harris et al. 2006). El exceso de HA sobre la NA es quizás un reflejo de la interacción débil que tiene la HA con los residuos de ácido siálico y la necesidad de formar varias conexiones para formar una interacción estable. La posición y la cantidad de NA presente en el virión juega un papel importante en ganar acceso a los residuos de ácidos siálicos en la superficie celular; su actividad catalítica puede influir directamente en la eficiencia de la liberación viral, en el movimiento de las partículas a través de la mucosidad y por ende en la infección de nuevas células. La morfología del virión también puede contribuir a alterar la distribución y la cantidad de NA y HA en la superficie del virión, potencialmente afectando la capacidad replicativa viral y la cinética de replicación. Finalmente, la capacidad de la NA de acceder a su sustrato ya sea por la distribución de la NA en el virión o por variación en la longitud de las espículas de NA puede influir significativamente tanto la unión de HA a un receptor como en la escisión por NA del receptor (McAuley et al. 2019).

La rápida compensación de las mutaciones del escape antigénico es importante para mantener la capacidad replicativa durante la deriva antigénica. Muchos residuos dispersos que son determinantes de la antigenicidad en el dominio globular de HA también influyen fuertemente en la

avidez y la especificidad para los receptores de ácido siálico, y así las sustituciones de escape a los anticuerpos neutralizantes en estos residuos pueden afectar negativamente las interacciones con el receptor (Hensley et al. 2009). Como resultado, muchas de las mutaciones compensatorias que se han descrito en asociación con el escape antigénico afectan las interacciones del receptor y probablemente sirvan para restaurar las propiedades de unión al receptor. La necesidad de acumular mutaciones compensatorias en orden de combinar la novedad antigénica con la capacidad replicativa y la transmisibilidad se ha propuesto como explicación de la discordancia entre las altas tasas de mutación *in vitro* y la rápida selección *in vivo* con las tasas relativamente lentas de evolución antigénica a nivel poblacional visto con virus de la gripe (Koelle et al. 2006; Hensley et al. 2009). Los resultados indican que la glicosilación puede desempeñar un papel importante en este proceso. Este estudio revela un nuevo rol de la glicosilación en facilitar la evasión de la respuesta inmune a los virus Influenza compensando los costos de la capacidad replicativa de las mutaciones que escapan a la inmunidad (Kosik et al. 2018).

11.4. Evolución de glicoproteínas de superficie

Debido a la mala incorporación de nucleótidos por acción de la enzima viral ARN polimerasa ARN dependiente durante la replicación del genoma y a la naturaleza segmentada del genoma viral, es que estos virus evolucionan a través de la acumulación gradual de mutaciones y el reordenamiento del genoma, deriva antigénica y salto antigénico respectivamente (Petrova and Russell 2018).

Los VIB emplean una serie de mecanismos evolutivos que contribuyen a la variabilidad de estos virus, incluyendo (1) divergencia genética de genes que codifican para la proteína de superficie HA en los dos linajes (2) cocirculación de múltiples linajes en largos períodos de tiempo (3) reordenamientos frecuentes entre los virus circulantes que dan lugar a nuevas variantes con un genoma distinto (4) secuestro y reemergencia de linajes génicos (5) delección e inserción de nucleótidos en el gen HA. Por lo tanto, a pesar de que los VIB tienen tasas evolutivas más bajas mediante el empleo de estos mecanismos logran generar genomas diferentes resultando en brotes estacionales (Lindstrom et al. 1999).

La ubicación de la HA en la superficie viral sugiere que existe una fuerte presión de selección para la evolución de los epitopes, y los análisis de los patrones filogenéticos de este gen dan una idea de las fuerzas selectivas subyacentes (Volz et al. 2013). Sobre la glicoproteína NA también existe presión de selección indicando una adaptación viral al nuevo huésped, la evasión del sistema inmune del hospedador y también un equilibrio en la funcionalidad entre HA y NA (Tewawong et al. 2017b). Por otro lado, el mapeo estructural de las mutaciones encontradas en los “truncos” de los árboles filogenéticos demuestra que para ambos linajes de VIB los cambios se encuentran en los residuos que están más accesibles en la región globular de la HA (Langat et al. 2017).

A pesar de las diferencias en su dinámica epidemiológica y evolutiva, los genes de HA de los dos linajes de VIB evolucionan a una tasa de aproximadamente de $2,0 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (Vijaykrishna et al. 2015). Esta tasa es considerablemente más baja que las estimadas para los subtipos H3N2 y H1N1 de VIA que son de $5,5 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año y de $4,0 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año respectivamente (Rambaut et al. 2008). Las cepas del linaje B/Victoria acumulan más sustituciones no-sinónimas (dN) que sinónimas (dS) con respecto al linaje B/Yamagata. Del mismo modo, la filogenia de la HA del linaje B/Victoria exhibe una mayor relación dN/dS en las ramas internas que en las externas indicando que los cambios aminoacídicos se han fijado más frecuentemente en ese linaje que en el B/Yamagata. Estos resultados indican que el

linaje B/Victoria está bajo una mayor presión de selección positiva y por lo tanto es probable que experimente una mayor deriva antigénica que el linaje B/Yamagata que es más conservado (Vijaykrishna et al. 2015). La HA se caracteriza por tener un alto valor de la relación dN/dS en comparación con otros segmentos, le sigue la NA que es el segundo antígeno de superficie como también el segmento NS1 debido a su papel en evadir las respuestas inmunes innatas (Baigent and McCauley 2003). Estos tres genes también tienen una relación elevada de dN/dS en las ramas internas comparadas con las externas que el resto de los segmentos, reflejando una alta tasa de fijación aminoacídica como se espera bajo presiones de selección positiva (Pybus et al. 2007).

Como consecuencia de la presión inmune, la HA de los virus Influenza presenta grandes variaciones genéticas y aminoacídicas que se encuentran bajo selección positiva. Se ha sugerido que los sitios aminoacídicos en las posiciones 75, 116 y 122 son epítopes neutralizantes de la HA en las cepas del linaje B/Victoria; por otro lado, se ha demostrado que los sitios aminoacídicos en las posiciones 129 y 137 están sometidos a presión inmune en cepas del linaje B/Victoria y que el sitio 137 es reemplazado por el sitio 162 en las cepas que pertenecen al linaje B/Yamagata. Por otro lado se demostró que los sitios 197 y 199 se encuentran bajo presión selectiva positiva en ambos linajes (Nunes et al. 2008). Se sugiere que el sitio 197-x-199 puede constituir un epítope y que su glicosilación podría enmascarar el epítope haciéndolo inaccesible a los anticuerpos (Nakagawa et al. 2004). En varias ocasiones, el sitio de glicosilación 197-x-199 ha sido descrito por su influencia en la antigenicidad de HA de VIB (Nakagawa et al. 2000; Muyanga et al. 2001). Además se sabe que la presencia o ausencia de ese sitio de glicosilación depende de la célula en la que se replica el virus (Shaw et al. 2002; Saito et al. 2004). Para los dos linajes de VIB se han identificado los sitios que están bajo presión positiva en la región HA1 de la HA, para el linaje B/Victoria son los sitios 68, 73, 75, 77, 116, 118, 122, 129, 137, 164, 165, 170, 197, 199, 203 y 241 (Nakagawa et al. 2001b, 2006; Nunes et al. 2008) y para el linaje B/Yamagata son los sitios 75, 116, 122, 129, 137, 141, 147, 148, 149, 162, 197, 199 y 286 (Nakagawa et al. 2001a, 2003; Nunes et al. 2008).

Se identificaron que los sitios que estaban bajo presión selectiva en la región HA1 de la HA de VIB se encontraban en los cuatro epítopes antigénicos definidos para la HA de VIB (bucle-120, bucle-150, bucle-160 y hélice-190), esto apoya el rol de la selección de anticuerpos en la evolución molecular de la HA de los VIB (Shen et al. 2009). Estos hallazgos están en concordancia con un estudio posterior en el que se encontró variabilidad en las cuatro regiones antigénicas pero las posiciones no coinciden entre los linajes B/Victoria y B/Yamagata. Se encontró que los aminoácidos que más varían están localizados en la región del bucle-120 para ambos linajes y que hay más posiciones aminoacídicas con mayor variabilidad en B/Yamagata que en B/Victoria (Suptawiwat et al. 2017). Anteriormente se había demostrado que el epítope antigénico principal específico de linaje para B/Yamagata y B/Victoria se encontraba en los bucles 150 y 160 respectivamente (Nakagawa et al. 2001b, 2003). Esto está de acuerdo con los resultados de los análisis de entropía en los cuales se observó en el linaje B/Victoria un valor de entropía alto, mayor variabilidad, sólo en el residuo 146 mientras que el linaje B/Yamagata presentó varios residuos en la región del bucle-150 con valores de entropía altos (Suptawiwat et al. 2017).

Con respecto a la evolución de la glicoproteína HA, se ha observado que los dominios globular y de tallo de los VIB evolucionan a una velocidad similar para ambos linajes y también se observa que el dominio de tallo evoluciona mucho más lento que el dominio globular. Al comparar estas tasas de evolución con los VIA, se observa que ambos dominios de la HA de VIB evoluciona

lentamente y que el dominio de tallo tiene una tasa de evolución más lenta. Además se observa que los radios de evolución de ambos dominios en los VIB son mayores que los encontrados para VIA indicando que para VIB hay una mayor diferencia en las tasas de evolución de ambos dominios de la HA (Kirkpatrick et al. 2018).

Se ha observado que las mutaciones simultáneas en múltiples sitios antigénicos, llamadas también co-mutaciones, podrían acumulativamente mejorar la deriva antigénica. Un sitio en una proteína puede compensar a otro durante la evolución por lo que las co-mutaciones que ocurren allí están bajo presión de selección positiva y ocurren simultáneamente (Shih et al. 2007; Chen et al. 2016). Un estudio demostró que los sitios de co-mutación en la región HA1 de la HA de VIB se encuentran todos en los epítopes antigénicos sugiriendo una fuerte presión de selección por parte del sistema inmune hacia esos sitios. Para el linaje B/Yamagata se identificaron los sitios de co-mutación 48, 56, 75, 116, 182, 183 y 266 y se estableció una red que representa las reglas de los sitios de co-mutación. La misma red representando las reglas de los sitios de co-mutación para el linaje B/Victoria fue establecida y se identificaron en la HA1 los sitios 75, 88, 175, 199, 235 y 330. Este estudio también sugiere que el linaje B/Yamagata puede mutar más rápidamente que el linaje B/Victoria (Chen et al. 2016)

Varios estudios filogenéticos de las secuencias de NA han intentado dar una visión hacia el entendimiento de la evolución de los virus Influenza (Chen and Holmes 2008; Fourment et al. 2010; Xu et al. 2012). Como todo antígeno de superficie, la NA está bajo presión selectiva constante del sistema inmune del huésped. La selección de las variantes aminoácidas con mutaciones que impiden el reconocimiento de anticuerpos, llamada deriva antigénica, es uno de los mecanismos que impulsan la evolución de la NA de los VIB (Chen and Holmes 2008). Los patrones evolutivos del gen NA indican que ocurre una mayor deriva genética en los VIA que en VIB debido a una mayor tasa de sustitución aunque hay mayor diversidad genética para los VIB. Por lo tanto, existe una relación inversa entre la tasa evolutiva y la diversidad y este patrón evolutivo es similar al gen HA de los virus estacionales (Bedford et al. 2015; Tewawong et al. 2017b).

Las fuerzas de la presión selectiva que actúan sobre la NA también pueden surgir de interacciones con otros genes virales, de la estabilidad de la estructura proteica y de la adaptación a nuevas especies (Illingworth and Mustonen 2012). Se ha demostrado que la evolución de la NA ocurre por sustituciones aminoácidas que alteran sutilmente la conformación del dominio catalítico permitiendo que una forma diferente de ácido siálico se una al sitio activo (Kobasa et al. 1999). A pesar de que los residuos de aminoácidos en el sitio activo de NA están altamente conservados en los VIA y VIB, ciertas sustituciones identificadas en la NA de estos virus resistentes en humanos tienden a ser específicas de tipo o subtipo. Por ejemplo, las mutaciones R152K (Arg152Lys), D198N (Asp198Asn), I222T (Ile222Thr), H273Y (His273Tyr), H274Y (His274Tyr) y R371K (Arg371Lys) son específicas de VIB y están asociadas a residuos que se encuentran en el sitio activo de la NA. El sitio H273Y es resistente al fármaco Oseltamivir pero sensible a Peramivir y Zanamivir por otro lado la mutación R371K demostró ser resistente a los inhibidores de neuraminidasa Oseltamivir y Zanamivir (Monto et al. 2006; Sheu et al. 2008; Higgins et al. 2012).

Análisis de la estructura de proteínas revelaron que todos los sitios seleccionados positivamente se ubicaron en la superficie de la proteína NA y que pertenecían a sitios de unión de anticuerpos y/o a interacciones con las moléculas de azúcar de células huésped. Además, una serie de sitios

seleccionados positivamente que se sabe son sitios de unión a los inhibidores de la NA, indican una fuerte selección en virus de influenza con marcadores moleculares predictivos de resistencia antiviral. Para la NA de los VIB, se encontró que las posiciones 42, 65, 248, 345, 373, 389, 395 y 436 están bajo presión positiva (Xu et al. 2012). Con la introducción en el mercado de fármacos antivirales dirigidos hacia la proteína NA en el año 1999 se creó una fuente adicional de presión selectiva cambiando el entorno en el que la NA evolucionaba. A pesar de ser el blanco objetivo tanto en la neutralización por anticuerpos como para los fármacos antivirales, la NA no ha sido tan ampliamente estudiado como HA en referencia a las fuerzas de la presión selectiva que actúan sobre los genes codificantes (Correia et al. 2018). Por lo que, investigar las fuerzas de presión selectiva que actúan sobre un gen es importante para tener una mejor comprensión de su dinámica evolutiva. También permitiría la identificación de nuevas regiones potenciales hacia dónde dirigir los fármacos y/o encontrar objetivos alternativos para nuevos fármacos, siendo actualmente una prioridad dado el repertorio limitado que tienen los antivirales disponibles. Los inhibidores de la NA, actualmente constituyen la única clase de medicamento antiviral eficaz contra los virus influenza estacionales circulantes (Suzuki 2006). En un estudio se realizó análisis de secuencias a gran escala para investigar la presión selectiva a nivel global y específico de sitio que actúa sobre la NA. Se observó que la mayoría de los sitios dentro del gen NA variaban en los diferentes subtipos o linajes de los virus Influenza. Mientras que algunos sitios de presión selectiva son compartidos entre los linajes de VIB basados en la ubicación en la superficie de la proteína, los sitios seleccionados positivamente 395 y 106 para B/Victoria y B/Yamagata respectivamente, pueden estar bajo selección del sistema inmune del huésped. La identificación de posibles residuos de NA de contacto con anticuerpos para VIB es particularmente relevante ya que ningún epítipo fue completamente mapeado a la fecha (Correia et al. 2018).

Un estudio revela un nuevo papel para la glicosilación en la evasión inmune viral, independiente de sus conocidos efectos estéricos sobre el eclipsamiento del epítipo (Skehel et al. 1984; Medina et al. 2013). Estudios previos demostraron que la adición de glicanos generalmente deteriora la función de la HA mientras que aumenta drásticamente la capacidad replicativa en presencia de anticuerpos neutralizantes (Das et al. 2011). Mientras que los resultados de este nuevo estudio demuestran que la adición de glicanos también puede desempeñar el papel opuesto durante la deriva antigénica: aumentar la capacidad replicativa de las variantes antigénicas que escapan y restaurando las interacciones óptimas del receptor de HA, incluso en ausencia de presión selectiva de anticuerpos. Esto plantea la posibilidad de que ambos mecanismos contribuyan a la constante evolución de los N-glicanos unidos en el dominio globular observado durante la circulación de los subtipos virales humanos H1 y H3 de VIA (Kosik et al. 2018).

11.5. Reordenamientos

Los linajes B/Yamagata y B/Victoria frecuentemente intercambian sus segmentos y estas cepas se han detectado circulando desde 2001 provocando infecciones (Dudas et al. 2015; Kim et al. 2016), mientras que los virus B/Victoria muestran evidencia de reordenamientos continuos entre clados de su mismo linaje hay poca evidencia de que ocurran reordenamientos entre clados del linaje B/Yamagata manteniéndose constelaciones genómicas circulantes por más de 12 años (Langat et al. 2017). Los reordenamientos del linaje B/Victoria tienen relevancia a nivel epidemiológico debido a que las cepas de estos virus han circulado exclusivamente en Asia desde 1991 por lo que una proporción significativa de la población mundial, especialmente niños pequeños, no ha tenido la exposición a esos virus y por lo tanto no han desarrollado inmunidad natural. Además, las vacunas contra el virus Influenza administradas en la mayoría de los países

en los 10 años posteriores al resurgimiento, solo se incluyeron cepas del linaje B/Yamagata como componente de la vacuna contra la Influenza B (Xu et al. 2004).

Algunos estudios demostraron eventos de reordenamiento de cepas aisladas de VIB donde la HA pertenecía al linaje B/Victoria y la NA al linaje B/Yamagata (Tsai et al. 2006; Chen et al. 2007b). También se encontraron que varias de estas cepas reordenantes se diseminaron en varias partes del mundo durante la temporada 2001-2002 y se han convertido en las cepas de VIB predominantes en muchos países (Shaw et al. 2002).

La mayoría de los estudios del genoma completo de VIB describen reordenamientos de segmentos genéticos entre linajes o dentro del linaje pero no describen reordenamientos a nivel de clado y subclado (Chen and Holmes 2008; Yang et al. 2012; Zhu et al. 2013; Patil et al. 2013; Tewawong et al. 2015; Dudas et al. 2015; Vijaykrishna et al. 2015; Fang et al. 2015; Sam et al. 2015). Sin embargo, en un estudio epidemiológico molecular de VIB realizado entre 2012 y 2014 en Malasia se sugirió como emergente a la cepa *B/Phuket/3073/2013* del linaje B/Yamagata debido a un evento de reordenamiento entre clados dentro del mismo linaje (Oong et al. 2015). Esto dio lugar a la selección de esta cepa por parte de la OMS como candidata vacunal en 2015 para ambos hemisferios (WHO 2014, 2015). Además, en este estudio fueron identificados reordenamientos HA-NA entre subclados del mismo linaje y entre linajes diferentes (Oong et al. 2015, 2017). La baja prevalencia de cepas con reordenamientos HA-NA encontradas en la población sugiere que podrían no ser compatibles para la viabilidad del VIB o que no fueron diseminadas (Tewawong et al. 2017a).

A partir de un análisis de los patrones de reordenamientos, se indica que de los ocho segmentos de VIB solamente los segmentos PB1, PB2 y HA mantienen los dos linajes B/Victoria y B/Yamagata separados. También se evidencia que las cepas circulantes poseen segmentos genéticos de PB1, PB2 y HA derivados enteramente de uno o de otro linaje y que en los otros cinco segmentos genéticos ocurren repetidamente reordenamientos entre linajes reduciendo la diversidad genética. La pérdida periódica de diversidad en los segmentos PA, NP, NA y MP es consistente con la introgresión de un linaje en el otro en esos segmentos, mientras que el mantenimiento de los dos linajes paralelos de B/Victoria y B/Yamagata da como resultado una diversidad continuamente creciente para los segmentos PB1, PB2 y HA (Dudas et al. 2015). Por último, el gen NS exhibe un linaje separado sugiriendo que todos los virus semejantes a B/Yamagata y B/Victoria poseían un segmento de gen NS con un evento de reordenamiento y un origen desconocido (Chen and Holmes 2008).

12. Inmunidad

La importancia de la selección inmune también está reflejada en la alternancia del dominio de los dos linajes de VIB. Este patrón de dominancia alterna es compatible con un modelo en el que uno de estos dos linajes domina la población viral hasta que haya suficiente “inmunidad de rebaño” generado contra él, ya sea a través de la recuperación de la infección o la vacunación, y en ese momento el otro linaje puede aumentar en frecuencia (Chen and Holmes 2008).

La selección inmune es proporcionada por la asociación entre la progresión temporal de las cepas dominantes y los patrones cambiantes de antigenicidad. Por ejemplo, cuando grupos dominantes en temporadas sucesivas pertenecen al mismo linaje viral, siempre se observan diferencias antigénicas significativas entre los virus porque debe haber una selección directa para evadir la inmunidad del rebaño. En contraste, cuando un nuevo grupo dominante deriva en un linaje viral diferente a la cepa dominante anterior, no se observan cambios progresivos en la antigenicidad,

deduciendo que surge debido a que no hay un requerimiento de selección por ser antigénicamente diferente (Chen and Holmes 2008). La presión de selección evolutiva sobre la antigenicidad del virus Influenza deriva principalmente de la inmunidad inducida por infecciones o vacunas previas. La extinción de una variante “vieja” ante la aparición de otras nuevas, evidencia que ocurre una selección inmune en el virus Influenza. Sin embargo, los mecanismos de selección que se llevan a cabo dentro del hospedador no son del todo comprendidos y es necesario también considerar características temporales y espaciales como también la comprensión de los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa en individuos naive y con inmunidad generada (Smith et al. 2004). También se especula que la predicción del linaje dominante puede ser posible si se cuantifica la interferencia epidemiológica entre ellos (Nyirenda et al. 2016).

En individuos que no han sido expuestos a antígenos del virus Influenza, la infección está controlada en gran medida por la respuesta inmune innata. Tras la exposición inicial al virus, la barrera mucosa crea una capa de mucus rica en ácido siálico, que actúa como señuelo al unirse a la HA viral y por lo tanto atrapa una porción sustancial de virus, reduciendo efectivamente la dosis infectante (Cohen et al. 2013; Wu et al. 2016). Después de que el virus ha infectado las células, se dispara la respuesta mediada por interferón resultando en el rápido establecimiento de un estado antiviral que limita la permisividad de las células cercanas a la replicación del virus (Guillot et al. 2005). La eficiencia de la respuesta inmune innata es dependiente de la dosis infectante, de la inmunogenicidad del virus que conduce a un estado proinflamatorio y de factores genéticos del hospedero (Petrova and Russell 2018).

La naturaleza recurrente de las epidemias y de la vacunación repetida del virus Influenza da como resultado un mosaico complejo de anticuerpos y células de memoria. Para un individuo, la fuerza de la respuesta inmune va a depender del historial de exposición que haya tenido al virus o de la exposición a antígenos vacunales, de la similaridad del antígeno infectante a los antígenos que previamente estuvo expuesto y del decrecimiento gradual que puede llevar a una reducción de la presión de selección a pesar de tener exposiciones previas (Petrova and Russell 2018).

Estudios sugieren que la inmunidad contra el linaje B/Yamagata es más corta que la inmunidad contra B/Victoria, como también que el linaje B/Victoria está bajo una mayor presión de selección debido a la inmunidad del hospedador y que la antigenicidad de B/Victoria cambia mucho más rápido que el linaje B/Yamagata. Por lo tanto, si la inmunidad por sí misma mengua rápidamente, el linaje B/Yamagata no puede estar suficientemente bajo la presión de selección del sistema inmune del hospedador y los cambios de antigenicidad no serían necesarios para la persistencia del linaje. Además, la distribución por edad más amplia de la infección que es observada en el linaje B/Yamagata con respecto al B/Victoria implica eventos de reinfección frecuente, apoyando la idea de que la inmunidad de este linaje mengua mucho más rápido que el linaje B/Victoria (Vijaykrishna et al. 2015; Nyirenda et al. 2016).

Otro estudio realizado en Europa en niños de 0 a 7 años de edad sin historial de vacunación, demostró que estas personas acumularon inmunidad natural contra VIB mucho más lento que la generada para VIA. Esta observación probablemente explica el aumento de la incidencia de la enfermedad con VIB en relación con VIA entre niños mayores y adultos jóvenes (Bodewes et al. 2011).

Dependiendo de la dosis infectiva en individuos expuestos por primera vez, los virus que escapan a la respuesta inmune innata alcanzan un pico en el título viral a las 24–72 horas después de la

infección. Sin embargo, el tiempo requerido para la generación de nuevos anticuerpos específicos es de 7 a 10 días luego de la infección. Además de la baja presión de selección sobre el virus durante la infección primaria, la naturaleza aguda de las infecciones conduce a una exposición transitoria de los antígenos virales por lo que se requiere una presencia más prolongada del antígeno para desarrollar una selección inmune adaptativa altamente específica. Por lo tanto, los individuos van a requerir más de una infección o vacunación para generar anticuerpos altamente específicos que les confieran protección (Petrova and Russell 2018).

Un desafío para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva al virus de la gripe es la naturaleza aguda de la infección, el corto período de infección significa que la respuesta inmune innata local es crítica para restringir y eliminar la infección. La activación de esta respuesta conduce a la inducción de interferón en respuesta antiviral y a la secreción de citocinas proinflamatorias, ayudando a restringir la replicación de virus, de lo contrario se produce infección primaria (Wong and Webby 2013). Después de la infección primaria, exposiciones posteriores a variantes antigénicas encontradas previamente inducen respuestas inmunes de la mucosa. Tales respuestas son en gran medida mediadas por anticuerpos de inmunoglobulina A (IgA) en el tracto respiratorio superior que son capaces de cruzar las barreras epiteliales. Siempre que se generen anticuerpos altamente específicos en una nueva infección por la misma variante, ésta puede ser rápidamente contenida activando una mínima respuesta inmune lo que explicaría la reducción en las respuestas serológicas después de cada infección posterior con cepas homólogas del virus Influenza (Petrova and Russell 2018).

Infecciones secundarias con reacción cruzada parcial de las variantes antigénicas típicamente conducen a la generación de anticuerpos neutralizantes tempranos incompletos. Como la mayoría de las infecciones por el virus Influenza resultan en la recuperación de algún anticuerpo de memoria, los individuos suelen tener mayor acumulación de anticuerpos contra virus encontrados en etapas más temprana de la vida. Durante las infecciones en que la respuesta inmune está dominada por un reclutamiento de la memoria inmune, existe la posibilidad de una presión de selección inmune para nuevas variantes antigénicas que surgen pero esto estará limitado por la naturaleza aguda de las infecciones, por el predominio de las infecciones existentes y por el tamaño reducido de la población viral en el cual la selección puede ejercer sus efectos (Petrova and Russell 2018).

Es cada vez más reconocido que la inmunidad del hospedero a la proteína NA es necesaria para obtener una respuesta de anticuerpos y mejorar la protección hacia el desafío de la gripe (Lambert and Fauci 2010). Anticuerpos generados contra la proteína NA generan agregados virales sobre la superficie celular, inhiben la liberación de los viriones y a menudo están dirigidos contra epitopes conservados de la NA (Marcelin et al. 2012). La mayor inhibición hacia la NA está fuertemente correlacionada con la protección contra las infecciones y con la reducción de la gravedad de la enfermedad (Monto et al. 2015; Memoli et al. 2016). Existen varios mecanismos por los cuales los anticuerpos pueden inhibir la gripe durante diferentes pasos del ciclo viral. Los anticuerpos contra HA pueden neutralizar el virus directamente bloqueando el contacto inicial con los receptores celulares, también pueden interferir con cambios conformacionales de la HA y/o con las interacciones entre la membrana viral y la membrana endosomal requeridas para la fusión. Hacia etapas finales del ciclo, los anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia la glicoproteína NA han demostrado prevenir la liberación de la progenie viral de las células infectadas (Han and Marasco 2011). La susceptibilidad del virus influenza a la neutralización depende en parte de la fuerza de unión del anticuerpo a la HA expresada en la superficie viral, cuanto mayor es la afinidad del

anticuerpo hacia la HA mayor es la neutralización. Sin embargo, el determinante preeminente de la neutralización del virus es la naturaleza del epítotope viral (Knossow and Skehel 2006). La neutralización no es directamente proporcional a la afinidad del anticuerpo, sin embargo las propiedades del epítotope son factores primarios para determinar la eficiencia de la neutralización. Esto sugiere que las estrategias vacunales que se centran en la inducción preferencial de anticuerpos neutralizantes del epítotope más potente son más propensas a tener los efectos más duraderos sobre la neutralización y evitar el escape de la neutralización (Han and Marasco 2011).

13. Tratamiento y prevención

Las infecciones agudas respiratorias son una de las principales causas de muerte en niños y adultos e Influenza es de las pocas infecciones respiratorias que puede ser prevenida y/o tratada con vacunas y drogas antivirales (Gerdil 2003).

13.1. Vacunas

Los problemas de salud pública planteados por las infecciones se ven agravados por la capacidad que tiene el virus de transmitirse de manera eficiente y por las limitadas opciones terapéuticas que existen actualmente para tratar las infecciones. Por lo tanto, la vacunación sigue siendo la mejor intervención médica para proteger a los humanos contra la Influenza estacional. Sin embargo, la eficacia de las vacunas actuales contra la gripe es subóptima debido a que el genoma segmentado del virus proporciona una ventaja evolutiva que le permite reordenarse o intercambiar segmentos entre diferentes cepas virales dentro del mismo tipo (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). Además, debido a la rapidez con la que ocurre la deriva antigénica se generan mutantes virales de la NA con resistencia a los antivirales disponibles y por otro lado se hace difícil predecir los cambios en la HA a ser incluidos en las vacunas que serían necesarios para proteger a la población contra futuras cepas epidémicas (Han and Marasco 2011; Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

Debido a que las vacunas contra la gripe no inducen títulos de anticuerpos duraderos se recomienda la vacunación anual antes del comienzo del invierno, este hecho en sí mismo plantea dificultades para los países tropicales donde los picos dentro de temporada no están tan definidos (Wong and Webby 2013). Las vacunas trivalentes actuales contra la Influenza inducen inmunidad dependiente de subtipo contra H1N1 y H3N2 de VIA y contra un linaje de VIB. Estas vacunas estacionales están diseñadas para inducir principalmente anticuerpos contra la HA por lo que son estandarizados en función del contenido de HA (Gerdil 2003). La evaluación del linaje y el grupo prevalente en circulación es importante para seleccionar la cepa viral que se incluirá en las vacunas contra la Influenza y para evaluar la eficacia de la vacunación (Arvia et al. 2014). Desafortunadamente, las cepas que son seleccionadas para incluir en la vacuna no siempre coinciden con las cepas circulantes y esto provoca que baje la efectividad de la vacuna entre un 10% a 60% (Kirkpatrick et al. 2018). Con la aprobación en Estados Unidos de vacunas cuadrivalentes vivas atenuadas a partir del año 2012 (FluMist Quadrivalent, MedImmune) e inactivadas (Fluarix Quadrivalent, GlaxoSmithKline y Fluzone, Sanofi Pasteur), los CDC estiman una reducción del número de enfermedades por fiebre reportadas a causa de este virus (Reed et al. 2012; FDA 2013a, b, c; Ray et al. 2017).

Recientemente, se ha demostrado que la infección natural, pero no la vacunación, da como resultado la generación de respuestas de anticuerpos que se dirigen a la segunda glicoproteína de superficie, la NA. Esta glicoproteína está sujeta a una menor presión inmunológica que podría contribuir a cambios más lentos de aminoácidos en los sitios antigénicos (Sandbulte et al. 2011;

Krammer et al. 2018). Por otro lado, en un estudio utilizando como modelo cobayos se demostró que en un régimen de vacunación diseñado para inducir inmunidad de mucosas contra la NA, se afectaba negativamente la eficiencia de una segunda infección como también la transmisión del VIB (McMahon et al. 2019).

Un problema para los componentes de VIB en las vacunas trivalentes y cuatrivalentes es la dependencia del crecimiento de estos virus en huevos. Desde al menos el 2004, el crecimiento de los VIB en huevos puede provocar la pérdida de sitios de glicosilación en la HA lo cual alteraría la antigenicidad del virus y por ende afectaría la eficacia de la vacuna (Saito et al. 2004). Sin embargo, hay disponibles en el mercado vacunas preparadas de virus crecidos en células de mamíferos, por ejemplo Flucelvax, y vacunas recombinantes de HA expresadas en células de insecto, Flublok (An et al. 2019).

El test de potencia del ensayo de inmuno difusión radial simple (SRID por sus siglas en inglés de "Single Radial Immunodiffusion Assay") es utilizado habitualmente por fabricantes de vacunas y por las agencias reguladoras para cuantificar la cantidad de HA, realizar pruebas de estabilidad y aprobación de los lotes de producción (An et al. 2019).

Los virus que son utilizados para la fabricación de las vacunas contra Influenza son virus reordenados que contienen una mezcla de genes de diferentes virus. Por lo general los dos segmentos de las glicoproteínas de superficie HA y NA pertenecen a un mismo virus y son combinados con otros seis genes del genoma que son donados de una cepa de alto rendimiento, esto genera virus candidatos para la producción vacunal (Plant and Ye 2013).

Hay dos formas de diseñar un virus Influenza para la producción de vacunas, la primera es co-infectando una célula con dos virus, cada uno con el rasgo deseado y la segunda forma es aplicando la tecnología de genética reversa. La desventaja de la coinfección es que se pueden producir virus con combinaciones no deseadas de segmentos génicos, mientras que la genética reversa tiene como desventaja que algunas combinaciones de HA y NA podrían provocar un decrecimiento de la cuasiespecie (Plant and Ye 2013).

Los objetivos principales de las vacunas son la protección contra la infección y la enfermedad causada por infecciones de Influenza y la restricción de la transmisión del virus dentro de la población generando inmunidad de rebaño (Wong and Webby 2013; Nogales and Martínez-Sobrido 2016). La efectividad de las vacunas contra Influenza es variable y generalmente es mayor en niños y en adultos sanos menores de 65 años, mientras que en individuos mayores de 65 años se ha observado una reducción de la efectividad. Las recomendaciones para la vacunación contra Influenza difieren entre países y se realizan anualmente debido a que las vacunas no inducen una protección de anticuerpos duradera. Hoy en día, las vacunas estacionales más utilizadas contra Influenza se pueden dividir en vacunas inactivadas y vivas atenuadas (Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

Las vacunas contra el virus Influenza se producen tradicionalmente en huevos embrionados, pero también han surgido otros sustratos como las células de mamíferos en cultivos, los fabricantes de vacunas han invertido en estos últimos sistemas para la producción a gran escala sin la necesidad de utilizar huevos. La mayoría de las vacunas contra Influenza actualmente autorizadas son fabricadas por compañías biotecnológicas que utilizan huevos embrionados para la producción, sin embargo este proceso tiene múltiples inconvenientes como ser el acceso al sustrato y los tiempos de proceso requeridos. En el caso de las vacunas trivalentes inactivadas para adultos contienen aproximadamente 45 g de HA (15 g de HA viral de cada uno de los tres componentes

antigénicos) lo que significa que por cada huevo se obtienen de 7 a 10 dosis vacunales. Las vacunas de virus atenuados comparten pasos similares del proceso de producción en huevos lo que significa que por cada huevo se obtienen de 7 a 10 dosis vacunales (Wong and Webby 2013; Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

Los cultivos de células de mamíferos también son utilizados por la industria biofarmacéutica para la producción de vacunas. En 2012, la FDA aprobó una producción de vacunas en cultivos celulares pero ese proceso de fabricación, en los primeros años, comenzaba con el crecimiento de los virus en huevos embrionados por regulaciones de la administración. Por otro lado, la FDA aprobó dos líneas celulares, MDCK y Vero (la línea celular Vero proviene de células extraídas del riñón de monos verdes africanos), y se estima que en el futuro puedan reemplazar completamente el uso de huevos (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). En la búsqueda de encontrar alternativas que mejoren los sistemas de producción actuales, se han identificado combinaciones de mutaciones que incrementan los títulos de los virus candidatos en líneas celulares de mamíferos como también en huevos embrionados (Ping et al. 2016). La producción de vacunas contra Influenza en líneas celulares de mamíferos ofrece varias ventajas con respecto al primer sustrato mencionado: permiten alcanzar mayor capacidad de producción y mayor disponibilidad de sustrato para el crecimiento del virus, eliminar la dependencia del suministro de huevos y la posibilidad de ser criopreservados y amplificados en biorreactores en cualquier momento (Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

Las vacunas inactivadas generalmente se administran por vía intramuscular y se pueden clasificar como vacunas de virus enteros o vacunas fraccionadas, inducen una inmunidad humoral protectora al producir anticuerpos dirigidos contra epítopes de HA (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). Estas vacunas solo son eficaces cuando coinciden con las cepas circulantes (Gerdil 2003; Berlanda Scorza et al. 2016). Con el tiempo, la glicoproteína HA acumula en sus sitios antigénicos cambios de aminoácidos, lo que lleva a una deriva antigénica que hace que las vacunas del año anterior sean ineficaces y fuerza a la reformulación anual y a la readministración de vacunas contra la gripe (Krammer and Palese 2015; Berlanda Scorza et al. 2016).

Las vacunas de virus enteros fueron las primeras en desarrollarse. Para la fabricación de vacunas, los virus Influenza son cultivados en huevos embrionados, posteriormente son purificados, concentrados e inactivados químicamente con formaldehído. Las vacunas de virus enteros son seguras y bien toleradas con una eficacia del 60% al 90% en niños y adultos. Por otro lado, en las vacunas fraccionadas se exponen todas las proteínas virales tras la disociación de los viriones por tratamiento con un detergente iónico. La mayoría de las vacunas contra Influenza fabricadas en Estados Unidos y en Europa son producidas en huevos embrionados, inactivadas con formaldehído y luego de purificadas son tratadas con detergentes no iónicos (Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

A diferencia de las vacunas basadas en virus, las vacunas de subunidades consisten en proteína HA viral purificada o en las proteínas HA/NA sin los otros componentes virales. Estas vacunas de subunidades se pueden producir en huevos embrionados a partir de estas proteínas purificadas mediante la eliminación de los otros componentes virales. Además, las vacunas de subunidades pueden generarse utilizando nuevas tecnologías de fabricación como ser el uso de baculovirus como vectores de expresión y/o las tecnologías de ADN recombinante permitiendo la obtención de grandes cantidades de HA viral (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). En poblaciones sin inmunidad como los niños pequeños, las vacunas de subunidades o fraccionadas son menos

inmunogénicas y son requeridos dos dosis para alcanzar los títulos virales necesarios para generar inmunidad (Wong and Webby 2013).

Debido a que existe poca o ninguna protección cruzada entre los dos linajes del VIB, su efectividad podría reducirse en estaciones con un predominio diferente del linaje circulante o cuando los dos linajes se encuentran co-circulando. La inclusión de ambos linajes del VIB en la vacuna cuadrivalente puede reducir potencialmente la no coincidencia con las cepas circulantes y resolver este problema (Belshe 2010; Ambrose and Levin 2012). La magnitud de estas no coincidencias entre cepas vacunales y cepas circulantes varía de una estación a otra, por lo que las campañas de vacunación con vacunas cuadrivalentes permiten responder más efectivamente a la epidemiología actual del virus Influenza (Ambrose and Levin 2012; Ray et al. 2017). A partir de 2012, la FDA aprobó una vacuna cuadrivalente compuesta por dos virus del tipo B, uno del linaje B/Yamagata y otro del B/Victoria, además de los dos componentes tipo A. El componente adicional de VIB aumenta la carga de la capacidad de producción vacunal; por lo tanto, el desarrollo y la generación de candidatos del VIB con altos rendimientos para la vacuna estacional podría convertirse en un componente crítico en el aumento de la producción necesaria para la fabricación de la vacuna cuadrivalente (Le et al. 2015).

Basado en la carga demostrada para el VIB, la limitada protección cruzada entre los dos linajes y la incapacidad para predecir con precisión qué linaje será el próximo en circular, está claro que las vacunas contra la Influenza estacional mejorarían si se incluyen ambos linajes de VIB. La justificación del cambio de vacunas trivalentes a cuadrivalentes es similar a la transición en el año 1977 de una vacuna bivalente (A/H3N2 y B) a una vacuna trivalente (A/H1N1, A/H3N2, B), que se basó en la falta de protección cruzada entre las cepas circulantes en humanos. La inclusión de ambos linajes de VIB en la vacuna proporcionaría un beneficio directo cada vez que una gran cantidad de cepas circulantes no coincidan con el linaje elegido en la vacuna trivalente ya sea por una predicción incorrecta o porque ambos linajes circulan en un grado significativo (Ambrose and Levin 2012). Además, en temporadas en las cuales la circulación del VIB es mínima o cuando no coincide con la cepa en la vacuna trivalente, la inmunización con una vacuna cuadrivalente proporciona beneficios al individuo al aumentar su propia inmunidad a ambos linajes con potencial benéfico para temporadas posteriores y para la población. La inmunidad acumulada podría ser más relevante en VIB que en VIA debido a que evolucionan más lento (Ambrose et al. 2008).

Un paso crítico en la producción a gran escala de las vacunas inactivadas contra el virus Influenza es el desarrollo de virus candidatos de alto crecimiento o rendimiento mediante el reordenamiento clásico (Le et al. 2015). En el desarrollo de virus con reordenamientos se ha empleado la técnica de genética reversa basada en el rescate de virus infecciosos de plásmidos transfectados que codifican para los ocho segmentos génicos de Influenza. Los genes que codifican para las dos glicoproteínas de superficie (HA y NA) provenientes del virus silvestre y los otros seis segmentos genéticos internos provenientes del virus donante se clonan en ocho plásmidos diferentes y posteriormente se transfectan células. Utilizando un sistema de ocho plásmidos, la genética reversa se ha aplicado con éxito para crear reordenamientos de VIB (Hoffmann et al. 2002). Las cepas del VIA que se usan en la fabricación de vacunas son reordenamientos 6+2 con alto rendimiento de crecimiento y contienen los genes HA y NA de las cepas objetivo. Para coinfectar se utiliza la cepa modificada A/PuertoRico/1934 H1N1 llamada PR8 que contiene seis genes del virus Influenza menos los genes de HA y NA que son aportados por las cepas estacionales seleccionadas. PR8 tiene un perfil de seguridad favorable para ser utilizado en humanos y replica con altos títulos en huevos embrionados y células. Para generar los virus reordenantes, los

huevos embrionados son coinfectados con PR8 y con las cepas vacunales estacionales. La selección de los virus apropiados que serán candidatos para la generación de vacunas se realiza mediante amplificación en presencia de anticuerpos dirigidos contra HA y NA PR8. Luego de la selección, los virus son clonados y secuenciados para su confirmación. Los VIB incluidos en las vacunas generalmente son de tipo silvestre, aunque se han utilizado reordenamientos de estos virus cuando las propiedades de crecimiento viral de la especie silvestre es subóptima (Wong and Webby 2013; Nogales and Martínez-Sobrido 2016). Aunque la genética reversa es una herramienta invaluable en el estudio de la biología de los virus Influenza, vale la pena señalar que el reordenamiento clásico ofrece ventajas en el desarrollo de virus candidatos para la producción de vacunas contra la influenza. El reordenamiento clásico se realiza completamente en huevos embrionados, lo que permite la selección de combinaciones de genes y variantes virales (o mutaciones menores) que maximizan el potencial de crecimiento viral en el sustrato (Le et al. 2015). Por ejemplo, al comparar los dos métodos en el desarrollo de virus candidato de la cepa pandémica de VIA 2009, se informó que ambos métodos eran capaces de generar reordenamientos con un tiempo de preparación similar. Sin embargo, los reordenamientos producidos por el método clásico produjeron mayores rendimientos en huevo y fueron los virus candidatos preferidos por la mayoría de los fabricantes de vacunas. La configuración génica fue 5:3 (cinco genes internos del virus donante y tres segmentos génicos: HA, NA y PB1 del virus silvestre A/California/07/2009) (Robertson et al. 2011).

Se ha demostrado que los adyuvantes mejoran la respuesta inmune provocada por un antígeno y podrían ser utilizados para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas inactivadas y para reducir la dosis vacunal y la cantidad de administraciones. Actualmente, la FDA ha aprobado licencia para el uso de algunos adyuvantes en la fabricación de vacunas de Influenza como ser las sales de aluminio (alumbre), sistemas de emulsión de aceite escualeno en agua, MF59 (Wadman 2005, Laboratorio Novartis) y AS03 (Laboratorio GlaxoSmithKline). Sin embargo, la mayoría de las vacunas disponibles no contienen adyuvantes debido a que están bajo investigación (Wong and Webby 2013; Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

Las vacunas vivas atenuadas se desarrollaron en la década de 1960 mediante el pasaje de los virus en huevos embrionados utilizando condiciones de temperatura subóptimas. Su administración intranasal imita la ruta natural de la infección por virus induciendo una respuesta de anticuerpos más duradera y pudiendo ser administrada en niños de 2 a 7 años de edad (Wong and Webby 2013; Nogales and Martínez-Sobrido 2016). Las cepas resultantes mostraban tener fenotipos sensibles a la temperatura, adaptadas al frío o atenuadas cuando eran crecidos luego a 25°C pero no a las temperaturas que se encuentran en las vías respiratorias inferiores que es mayor a 35°C. Debido a que estos fenotipos restringían la replicación del virus a la parte superior de las vías respiratorias podían inducir respuestas inmunológicas protectoras locales (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). Más recientemente, con el desarrollo de la genética reversa ha sido posible clasificar los segmentos virales clonados y elegir las cepas que serán utilizadas como candidatos en la producción vacunal y esta metodología de adaptación al frío y de mutaciones atenuadas ha sido ampliamente empleada para la producción de las vacunas vivas atenuadas (Jin et al. 2012). Este tipo de vacunas está disponible en Estados Unidos desde el 2003 bajo la marca comercial FluMist y es administrado por vía intranasal. La ventaja de esta administración con respecto a los virus de vacunas inactivadas es que al aplicarse en la mucosa nasal se puede generar una inmunidad local, generando anticuerpos, reactividad cruzada y una respuesta inmune de mayor duración. Las cepas de estas vacunas consisten en seis genes internos que son brindados por un virus donante atenuado y las dos glicoproteínas de superficie HA y NA que son

seleccionadas de los virus estacionales circulantes y estas cepas reordenantes son generadas por reordenamiento clásico en huevos embrionados como en el caso de las cepas inactivadas o por genética reversa (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). A partir de la temporada 2019-2020, los cuatro virus utilizados en las vacunas estacionales son derivados únicamente de células, convirtiéndola en una vacuna sin huevos (CDC 2019). Debido a los problemas de efectividad de la vacuna FluMist que han surgido en las últimas tres temporadas (2013–2014, 2014–2015 y 2015–2016), destaca la importancia crítica de la inversión continua en el desarrollo de vacunas vivas atenuadas más eficaces. Con respecto a esto se han demostrado que mutaciones análogas en las subunidades de las proteínas PB1 y PB2 generan virus estables con un fenotipo atenuado como ocurre con cepas de VIA. (Santos et al. 2017).

Las técnicas de genética reversa han permitido generar virus Influenza recombinantes y proporcionan una tecnología poderosa para el desarrollo de vacunas tanto inactivadas como vivas atenuadas en vivo pudiendo seleccionar cepas para la generación de vacunas más seguras y efectivas (Nogales and Martínez-Sobrido 2016).

13.2. Nuevas tecnologías de suministro y fabricación

Es probable que las mejoras en la vacuna de la gripe se produzcan mediante el desarrollo de distintas plataformas; se están investigando varias tecnologías de fabricación que incluyen el uso de antígenos de HA expresados o vectorizados y/o la selección de diferentes antígenos virales (Wong and Webby 2013).

Una tecnología relativamente avanzada que está siendo utilizada para fabricar vacunas de Influenza es el sistema de vectores de expresión de baculovirus (BEVS del inglés Baculovirus Expression Vector System). Los baculovirus son virus de ADN que infectan insectos, específicamente a los de la especie lepidópteros. FluBlok (Protein Science), es una vacuna trivalente recombinante de HA derivada de células patentadas de insectos SF9 (ExpresSF) de la compañía y que ha sido aprobada por la FDA para su uso en personas entre 18 y 49 años. Debido a que la producción ocurre en células de insecto, la HA recombinante obtenida no se divide en sus dos subunidades por lo que retiene todos los dominios antigénicos y se obtienen dosis más altas y se espera que tenga una inmunidad comparable a la inducida por las vacunas trivalentes convencionales. Las principales ventajas de este sistema son la escalabilidad y la rápida producción sin embargo no es tan eficaz en niños menores de 5 años (King et al. 2009; Baxter et al. 2011; Treanor et al. 2011). También se ha explorado generar vacunas contra Influenza en casi todos los sistemas virales vectorizadas. Adenovirus, poxvirus, parainfluenza y los sistemas de alfavirus se están utilizando para desarrollar vacunas, aunque la mayoría no han avanzado más allá de los estudios preclínicos. Resumidos en (Wong and Webby 2013).

Las partículas similares a virus (VLP del inglés Viral-like particles) son esencialmente partículas virales con un "núcleo hueco" formadas por la expresión y el autoensamblaje de una única proteína estructural viral. Estas partículas conservan la morfología y la antigenicidad pero son incapaces de replicar debido a que no contienen genoma (Wong and Webby 2013). En el caso del virus Influenza, estas partículas son a menudo producidas por la co-expresión de HA, NA, M1 y algunas veces M2 sin embargo HA y NA son suficientes para la producción de estas partículas (Latham and Galarza 2001; Chen et al. 2007a). La facilidad de manipulación es una de las principales ventajas de la plataforma y desde la perspectiva de fabricación se pueden producir rápidamente y son rentables, seguras y escalables. Aunque son prometedoras, estas vacunas

siguen con estudios principalmente en animales y con algún estudio de fase II en humanos (Wong and Webby 2013).

Aunque no sea una tecnología nueva, también se están desarrollando vacunas de ADN para el control de la gripe. Muchos de los beneficios teóricos de estas vacunas, como ser la rápida generación y la facilidad de intercambio de inmunógenos, son atractivos para la producción, por lo que se están realizando varias formulaciones que se han aplicado a estudios preclínicos. Resumido en (Wong and Webby 2013).

Como las vacunas actuales ofrecen poca protección contra las cepas del virus Influenza debido a una deriva antigénica impredecible y/o a nuevos subtipos emergentes, estas limitaciones enfatizan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias vacunales como las vacunas universales que inducirían inmunidad contra varias cepas de virus de la gripe (Kim et al. 2019). Estudios previos sugieren que las proteínas internas conservadas, como la NP y M1, podrían ser buenos antígenos para una vacuna universal contra la gripe debido al alto grado de homología que presentan entre varios virus (Ulmer et al., 1993; Lee et al., 2008; Furuya et al., 2010; Fontana et al., 2014; Baranowska et al., 2015). Por otro lado, se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTL por su sigla en inglés Cytotoxic T Lymphocytes) específicos de virus son importantes mediadores de la inmunidad de protección cruzada contra una amplia gama de virus Influenza (van de Sandt et al., 2015; Hillaire et al., 2011a, b); y que las células T CD4 y CD8 de memoria residentes en los pulmones (T_{RM} del inglés Lung-resident memory), se ha descrito que proporcionan una protección mejorada contra distintas cepas de VIA (Teijaro et al., 2011; Turner et al., 2014; Wu et al., 2014; Zens et al., 2016). Investigaciones con vectores de adenovirus recombinantes que codifican la proteína NP de VIB en ratones sugieren que proporcionarían una amplia protección contra los dos linajes y se demostró que las células T CD8 T_{RM} en los pulmones son necesarias para la protección y la inmunización de la mucosa, estableciendo una completa protección contra la infección del VIB (Kim et al. 2019; Lee et al. 2019).

13.3. Tratamiento y profilaxis con drogas antivirales

El tratamiento y la profilaxis con medicamentos antivirales son otra opción para el control de la gripe. Son dos los Inhibidores de la Neuraminidasa (INA) aprobados por la FDA para las infecciones por el VIB: oseltamivir (Tamiflu, Roche) y zanamivir (Relenza, Glaxo-SmithKline) que están dirigidos contra la proteína de superficie viral de NA. La función de esta glicoproteína es escindir a los residuos de ácidos siálicos ubicados en la superficie celular, promoviendo la liberación de los viriones recién formados. Se obtienen mejores resultados cuando ambos fármacos son administrados 48 horas después de la infección al reducir complicaciones secundarias y disminución de la mortalidad (Burnham et al. 2013). Actualmente, la FDA ha aprobado un nuevo inhibidor llamado baloxavir marboxil que está dirigido hacia el complejo polimerasa de los virus Influenza (Mifsud et al. 2019).

Para el diseño de los INA las investigaciones se basaron en la estructura conservada del sitio activo de la NA (von Itzstein et al. 1993). Estos compuestos interrumpen el ciclo de replicación del virus previniendo la liberación del mismo de las células infectadas y puede interferir con el inicio de la infección (Colman 1994; Matrosovich et al. 2004). Si bien los INA pueden interactuar con múltiples residuos, la evidencia sugiere que lo hacen con un número limitado de residuos conservados o semiconservados, que en la NA de los VIB se identificaron como: E119G, D198N, R152K (McKimm-Breschkin 2002, 2013; Gubareva 2004) como también con R371K, H274Y, I122T, R292K y N294S (Kamali and Holodny 2013). Sin embargo, otros estudios sugieren que

mutaciones en otros residuos de NA también podrían conferir resistencia (Yen et al. 2006). Los INA que están dirigidos contra las glicoproteínas de superficie de los VIB son la única clase de medicamentos aprobados para la profilaxis y el tratamiento de pacientes infectados con este virus. El uso clínico de los cuatro INA disponibles actualmente difieren entre los países: oseltamivir cuya administración es oral y zanamivir que es administrado por inhalación están aprobados para su uso en todo el mundo; mientras que el peramivir administrado por vía intravenosa está aprobado en Japón, Corea del Sur y China y por último el laninamivir administrado por inhalación sólo está aprobado en Japón (Ambrose and Levin 2012).

El Oseltamivir es un profármaco (fosfato de oseltamivir) administrado oralmente y es el INA más recetado. Después del procesamiento por enzimas hepáticas en su forma activa, carboxilato de oseltamivir, se distribuye sistémicamente a todos los sitios potenciales de infección con una concentración plasmática máxima de 350 mcg/L (He et al. 1999). Oseltamivir está aprobado para el tratamiento de la gripe aguda en pacientes a partir de las 2 semanas de edad y mayores; también está aprobado para la profilaxis de la gripe en pacientes mayores de 1 año. El Zanamivir es otro fármaco INA aprobado por la FDA. Es administrado por inhalación a través de un inhalador, el compuesto activo ingresa directamente en el tracto respiratorio con una concentración plasmática máxima de 17–142 ng/ml y está aprobado tanto para el tratamiento de la gripe aguda como para la profilaxis en pacientes a partir de los 7 años de edad (Harper et al. 2009).

Poco después del desarrollo de ambos fármacos, se realizaron múltiples estudios para establecer su eficacia clínica contra la gripe en adultos y niños pero todos estos ensayos utilizaron diferentes criterios por lo cual no se pudo determinar la eficacia contra las infecciones por el VIB, sin embargo, estos estudios sugirieron que el oseltamivir era menos eficaz en el tratamiento (Hayden et al. 1997, 1999b, a; Monto et al. 1999; Treanor et al. 2000; Nicholson et al. 2000; Whitley et al. 2001; Cooper et al. 2003).

Estudios clínicos realizados principalmente en Japón, que es un país con el mayor uso de INA per cápita se han demostrado que el oseltamivir es menos efectivo en el tratamiento de la influenza B que la influenza A principalmente en niños (Kawai et al. 2006; Sugaya et al. 2007; Sato et al. 2008).

En un estudio con un número reducido de pacientes, se demostró que el zanamivir es igualmente efectivo para las infecciones con Influenza A y B, en términos de porcentajes de pacientes afebriles después de 24 y 48 horas. Otro estudio con un número mayor de pacientes informó que no hubo diferencias significativas entre pacientes con Influenza A y B en el porcentaje de afebriles luego de 24 o 48 horas después de la primera inhalación con zanamivir. En general, la terapia con zanamivir fue más efectivo que el oseltamivir para el tratamiento de la gripe B (Kawai et al. 2008).

Se ha utilizado el meta-análisis para identificar y poder sacar conclusiones de la eficacia del oseltamivir de los numerosos informes. Desafortunadamente, estos análisis no se delinearon para el tratamiento de INA contra la influenza B, pero sugieren que el oseltamivir es efectivo en reducir la duración de la enfermedad. Resumidos en (Burnham et al. 2013).

14. Resistencia entre los VIB a los INA

Las NA de los virus de la gripe A y B son estructuralmente similares pero la homología de aminoácidos es solo del 30% (Colman 1994). Sin embargo, los 19 aminoácidos que conforman el

sitio catalítico de esta glicoproteína están altamente conservados entre todos los VIA y VIB (Colman et al. 1993). El sitio catalítico incluye los residuos R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 e Y406, numeración N2, que tienen una interacción directa con su sustrato que es el ácido siálico y los residuos de los alrededores E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294 y E425 que estabilizan al sitio activo (Colman et al. 1983; Burmeister et al. 1992a).

La aparición de los VIA y VIB resistentes a los INA que conservan su capacidad de causar enfermedades y de transmitirse de manera eficiente en la población humana es un importante problema de salud pública. Estos virus resistentes pueden emerger bajo presión de selección de drogas (Volz et al. 2013) o pueden ocurrir naturalmente sin intervención farmacológica y ambos están asociados con sustituciones de aminoácidos en o cerca del sitio activo (Richard et al. 2011). Las sustituciones de aminoácidos ubicados dentro del sitio activo de la NA no solo podrían reducir la susceptibilidad de los INA al VIB sino que también afectaría la capacidad replicativa viral que está definido como la adaptación de un virus a un entorno dado. Estas sustituciones podrían generar virus con una capacidad replicativa similar, salvaje=resistente, con capacidad replicativa disminuida, salvaje>resistente o con una capacidad replicativa mejor, salvaje<resistente (Baranovich et al. 2011).

Una parte importante de los estudios de vigilancia es la determinación de la susceptibilidad antiviral que permite la detección de la emergencia y propagación de nuevas variantes de Influenza resistentes a los medicamentos. Estos estudios se basan en el análisis estadístico de los datos obtenidos de un gran número de muestras de diferentes temporadas y áreas geográficas por lo que pueden proporcionar orientación para el tratamiento antiviral de la infección por Influenza (Burnham et al. 2013). También estos estudios de vigilancia han demostrado la actividad de los INA contra la NA de los VIB in vitro e indican baja frecuencia de circulación de variantes farmacorresistentes (Hurt et al. 2004; Monto et al. 2006; Escuret et al. 2008; Sheu et al. 2008; Tashiro et al. 2009; Okomo-Adhiambo et al. 2010). Ensayos de susceptibilidad antiviral de los VIB derivados de estudios de vigilancia y experimentales han identificado un espectro de sustituciones de aminoácidos que reducen la inhibición de los INA y que se encuentran ubicados en residuos conservados de la NA, E119A, R152K, D198E/N/Y, I222T/V, H274Y, R292K, N294S y R371K (Jackson et al. 2005; Hatakeyama et al. 2007; Nguyen et al. 2012a, b; Burnham et al. 2013; Leang et al. 2014). Se observó que los virus que contenían las mutaciones G109E, E119A, D197E y I222T como también la mutación R152K en el sitio catalítico eran resistentes al zanamivir. Mientras que los virus con mutaciones en E105K, G109E, E119A, D197E, I221V, I222T, H274Y, R292K y N294S o con una mutación en los alrededores del sitio, D198N, o cerca del centro enzimático, G402S, eran resistentes al oseltamivir (Ison et al. 2006; Hurt et al. 2006; Hatakeyama et al. 2007, 2011; Sheu et al. 2008; Oakley et al. 2010; Bastien et al. 2011; Fujisaki et al. 2012; Garg et al. 2013; Doyle et al. 2013; Kuo et al. 2016). Por último, se identificaron que las mutaciones E105K, D197E y H273Y (H274Y) son resistentes al INA peramivir (Kuo et al. 2016). Además, estos estudios también evidenciaron que la mutación D197N (Hatakeyama et al. 2007) ubicada en los alrededores del sitio catalítico, y la mutación I222T (Hatakeyama et al. 2011) se asocian con una susceptibilidad reducida al oseltamivir y al zanamivir. En estudios de vigilancia, se aisló de un paciente inmunocomprometido después de un tratamiento prolongado con oseltamivir una cepa de VIB con una nueva sustitución I221L, numeración B en NA, que confiere una resistencia al oseltamivir (Escuret et al. 2014). Otros estudios de vigilancia realizados durante 2010 a 2015 en Tailandia encontraron sustituciones aminoácidas en el gen de la NA en posiciones A395E/V/T/D/S, A245S y K360R, en el sitio catalítico de la NA, D151N/G, y en residuos de los alrededores, I222T/V. Se identificó para el clado 1 del linaje B/Victoria la mutación A395E y para el clado 2 del linaje B/Yamagata se identificó la mutación D197N, ambas resistentes al oseltamivir. Por otro lado, la mutación A395E ubicada fuera del sitio activo de NA está asociada

con una reducción en la susceptibilidad al oseltamivir y al peramivir (Leang et al. 2014; Tewawong et al. 2017b).

Los aislamientos clínicos identificados de pacientes que han sido sometidos a tratamiento con INA proporcionan evidencia directa del desarrollo de resistencia a estos inhibidores y por lo tanto son de particular importancia desde una perspectiva de salud pública. Información sobre la edad del paciente, el estado inmunocompetente, el inicio y la duración del tratamiento antiviral y la presencia de contactos familiares cercanos infectados son parámetros importantes para comprender la frecuencia de generación y la transmisibilidad de los VIB con susceptibilidad reducida a los INA (Burnham et al. 2013).

15. Vigilancia

La red de vigilancia mundial de Influenza de la OMS (GISN, del inglés WHO Global Influenza Surveillance Network) está conformado por 4 centros colaboradores (CCs, del inglés Collaborating Centers), 4 laboratorios regulatorios y 141 Centros Nacionales de Influenza, CNI (NICs, del inglés National Influenza Centers) en más de 107 países o Estados. Esta red de vigilancia tiene como objetivo la recopilación de datos para el proceso de selección de las cepas vacunales. Los estudios de vigilancia de esta red también ayudan a comprender la evolución del virus por ejemplo detectar nuevas variantes o virus, como también patrones de circulación y comprender su epidemiología en diferentes áreas geográficas. Cada CIN recolecta y analiza muestras de virus estacionales para comunicar los resultados al Centro Colaborador de Referencia e Investigación sobre Influenza de la OMS que le corresponda. Existen cuatro centros que pertenecen a la red: (1) CDC en Atlanta, Estados Unidos (CDC del inglés Centers for Disease Control and Prevention); (2) El Instituto Nacional de Investigación Médica en Mill Hill, Reino Unido; (3) GISN en Melbourne, Australia y (4) El Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas en Tokio, Japón (Wong and Webby 2013; Nogales and Martínez-Sobrido 2016; WHO 2019).

El foco de vigilancia del virus Influenza es la glicoproteína HA debido a que es el principal componente de las vacunas contra la gripe que están actualmente autorizadas y además porque genera respuestas inmunes neutralizantes protectoras (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). De acuerdo a las pautas de la OMS, se establecen dos sistemas de vigilancia del virus Influenza a través de personas que presentan síntomas similares a la Influenza o ETI (ILI, del inglés Influenza-Like Illness) y a través de pacientes hospitalizados con enfermedades respiratorias agudas graves o IRAG (SARI, del inglés Severe Acute Respiratory Illness) (WHO 2020a). Un paciente con ETI se define como cualquier persona con fiebre repentina mayor a 38°C y con tos o dolor de garganta en ausencia de otro diagnóstico (Yu et al. 2013). La definición de los pacientes con IRAG varía según las edades. Un paciente mayor a 5 años se define con IRAG si, al ingresar o durante el ingreso, presenta una fiebre repentina mayor a 38°C y tos o dolor de garganta, así como también taquipnea (frecuencia respiratoria mayor o igual a 25/min) o disnea (dificultad para respirar). Un paciente con menos de 5 años se define como IRAG si, al ingresar o durante el ingreso, presenta un inicio agudo de tos o disnea, y al menos uno de los siguientes síntomas: taquipnea (la frecuencia respiratoria varía según las edades dentro de esta franja), incapacidad para beber o amamantarse, vómitos, convulsiones, letargo o inconsciencia (Peng et al. 2015).

La producción de la vacuna contra Influenza es un desafío debido al tiempo de espera que se necesita para identificar las cepas virales predominantes que se encuentran circulando y el tiempo de producción necesario para la fabricación de la vacuna. Los CNIs realizan el aislamiento viral de muestras obtenidas de pacientes para identificar los virus circulantes y determinar si son capaces

de crecer eficientemente en cultivo. Normalmente, los virus Influenza son aislados utilizando células MDCK (MDCK por su sigla en inglés Madin Darby Canine Kidney), en lugar de huevos embrionados debido a que se ha informado tasas de aislamiento más elevadas especialmente para las cepas del tipo H3N2 del VIA. Aunque la mayoría de los virus de la gripe se aíslan de células de mamíferos, los virus deben ser cultivados y crecidos en huevos embrionados para la fabricación de vacunas debido a las regulaciones existentes. Hoy en día, las cepas vacunales se seleccionan entre 7 a 9 meses antes de la temporada en la que serán utilizados. La recomendación para las cepas incluidas en la composición vacunal para el hemisferio norte debe realizarse en el mes de febrero para dar tiempo a la producción de casi 300 millones de dosis que serán utilizadas para la temporada invernal en octubre/noviembre. Por otra parte, para el hemisferio sur las recomendaciones deben realizarse en setiembre para tener vacunas disponibles en marzo/abril del año siguiente (Nogales and Martínez-Sobrido 2016). El largo proceso de producción de vacunas es en gran parte causado por el uso de huevos embrionados en las tecnologías de producción de las vacunas y esta duración crea una ventana de oportunidades para que surjan nuevas variantes de virus que a menudo resulta en una disminución de la eficacia de la vacuna (de Jong et al. 2000).

Todos los CNIs que pertenecen al GISN realizan la vigilancia de acuerdo con los estándares globales de la OMS e informan el número total de muestras analizadas y de positivos en una plataforma en línea de acceso abierto llamada FluNet que está monitoreada por la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, del inglés Pan American Health Organization) y la OMS. Esta plataforma fue lanzada por primera vez en 1997 y los datos son actualizados semanalmente estando disponibles a todo el público, los resultados se presentan en varios formatos, incluyendo tablas, mapas y gráficos (Palekar et al. 2019; PAHO 2020; WHO 2020b).

Toda esta información es crítica para monitorear la circulación de los virus a nivel mundial e interpretar los datos epidemiológicos (Palekar et al. 2019). Por lo que, identificando las trayectorias evolutivas y prediciendo futuras mutaciones ayudaría a realizar recomendaciones de cepas más eficientes para las vacunas antes que una variante pudiera causar un brote de Influenza (Chen et al. 2016). El éxito de las campañas de vacunación actuales contra Influenza depende fuertemente de la extensiva vigilancia y de los recursos de fabricación para asegurar la entrega oportuna de la vacuna. Algunos de los puntos vulnerables son: (1) eficacia variable de las vacunas en poblaciones específicas debido a que son poco inmunogénicas y no inducen una respuesta de anticuerpos a largo plazo, (2) variabilidad de los virus por lo que la coincidencia entre las cepas vacunales y las circulantes es crítico, (3) tiempo de producción y limitaciones de fabricación y (4) disponibilidad limitada de las vacunas en países con recursos limitados (Wong and Webby 2013).

16. Diagnóstico

El personal de salud en los centros centinelas recoge muestras y las envían a los CNIs para realizar pruebas diagnósticas y evaluar la presencia del virus Influenza. En 2013, el CC de la OMS en Estados Unidos comenzó a proporcionar sin cargo kits moleculares de detección para el linaje del VIB en los países de Latino América (Palekar et al. 2019).

En Uruguay, el Centro Nacional de Referencia de Influenza, CNI (NIC, por sus siglas en inglés) está ubicado en la Unidad de Virología del Departamento de Laboratorios de Salud Pública en el Ministerio de Salud, en el cual son detectados también otros virus respiratorios no relacionados con Influenza. La vigilancia a nivel nacional se realiza anualmente en 6 centros centinelas de ETI

e IRAG estratégicamente seleccionados. Por otro lado, la vigilancia epidemiológica del virus Influenza es llevada a cabo por el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud.

Nuestro país tiene un clima cálido, donde los brotes con virus respiratorios generalmente ocurren en el período de otoño-invierno, entre los meses de abril y octubre.

Los datos virológicos procesados de muestras biológicas provenientes de pacientes con ILI o SARI se basan en la detección de antígenos mediante inmunofluorescencia y la detección del genoma viral mediante PCR en tiempo real para el virus Influenza y mediante PCR a tiempo final para otros virus respiratorios, incluidos el virus respiratorio sincitial, adenovirus, paramixovirus y metapneumovirus. Las muestras que son positivas para el VIA o para VIB se aíslan en cultivos celulares para su caracterización antigénica. También un porcentaje de las muestras positivas se envían al Centro Internacional de Colaboración ubicado en los Estados Unidos (CDC, Atlanta) para confirmar su caracterización y realizar las pruebas antivirales. La información virológica se ingresa en el sistema en línea del Departamento de Laboratorios donde están documentadas todas las muestras respiratorias recibidas. Toda esta información virológica como también la información epidemiológica se ingresa en una base de datos en línea de pacientes con IRAG. Así mismo, la información virológica de lo analizado se ingresa en la plataforma GISAID (del inglés, Global Initiative on Sharing All Influenza Data) (<https://www.gisaid.org/>). Esta plataforma permite el rápido intercambio de secuencias, datos clínicos, epidemiológicos y geográficos para ayudar a los investigadores a comprender cómo evolucionan y se propagan los virus (Shu and McCauley 2017).

17. Objetivos

17.1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características epidemiológicas y filogenéticas de los virus influenza B que circularon en Uruguay durante los años 2012-2019.

17.2. Objetivos específicos

- 1) Estudiar el grado de variabilidad genética de los genes de Hemaglutinina y Neuraminidasa de los virus Influenza B.
- 2) Determinar los grupos de edad asociados tanto con los linajes de VIB como con el tipo de vigilancia.
- 3) Comparar la participación y la distribución de los subtipos de los virus Influenza A que han circulado en Uruguay.
- 4) Determinar las relaciones genéticas entre las cepas circulantes en Uruguay y la región con las cepas vacunales utilizadas en Uruguay.

18. Materiales y métodos

18.1. Vigilancia Influenza y recolección de muestras

El Centro Nacional de Influenza (CNI) ubicado en Montevideo, Uruguay, en la Unidad de Virología del Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud, es el Laboratorio de Referencia para Influenza y otros virus respiratorios. Uruguay es un país con un clima cálido, donde los brotes provocados por virus respiratorios ocurren principalmente en el período otoño-invierno, entre los meses de abril a octubre. El sistema de vigilancia virológica se basa en el muestreo durante todo el año y se lleva a cabo en seis centros centinela, incluidos cinco hospitales generales y un hospital infantil ubicados estratégicamente en diferentes regiones del país.

Los aspirados nasofaríngeos o los hisopos nasales obtenidos de 5.299 pacientes hospitalizados con infección respiratoria aguda grave (IRAG) asociada con influenza y 455 pacientes ambulatorios con evidencia clínica de enfermedad similar a la influenza (ETI) se recolectaron entre el año 2012 y hasta la semana epidemiológica 45, 9 de noviembre, del año 2019. La vigilancia de ILI se implementó en 2017 donde los seis centros centinela ETI fueron los mismos que los de la red de vigilancia IRAG existente.

18.2. Métodos estadísticos

Los análisis de datos epidemiológicos y estadísticos se realizaron en base al total de muestras recibidas y procesadas y al total de muestras VIB positivas y con linaje determinado. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Epidat versión 4.1 (www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT) (Santiago Pérez et al. 2010), y los programas STATA y Excel.

La prueba de Chi cuadrado se aplicó para evaluar las diferencias en porcentaje de positividad entre los grupos comparados. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. La proporción de positivos de VIB entre las muestras positivas del virus Influenza se determinó en todos los años y para los dos programas de vigilancia por separado. La proporción del linaje B/Victoria y del linaje B/Yamagata que circularon cada año también fueron determinadas para aquellas muestras que estaban tipificadas.

Las comparaciones de la distribución de ambos linajes de VIB por edad se realizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson y la prueba de mediana. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Además, se examinó la proporción de cada linaje de VIB en los diferentes grupos etarios.

18.3. Detección molecular de VIB

18.3.1. Extracción de ARN y ensayos RT-PCR en tiempo real

El ARN fue extraído a partir de 140 μL de muestra clínica mediante el uso del kit comercial QIAamp® Viral RNA mini kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La muestra fue primeramente lisada bajo condiciones desnaturizantes para eliminar posibles RNAsas y asegurar el aislamiento del ARN intacto. Para ello se colocó en un eppendorf con 560 μL de buffer de lisis (Qiagen) y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Los siguientes pasos de extracción se realizaron de manera automatizada en un equipo QIAcube (Qiagen) en donde el producto eluido tuvo un volumen final de 60 μL . El ARN extraído se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar la amplificación.

Dado que la subtipificación de los VIB se implementó desde el año 2015 en el CNI en Uruguay, en este trabajo se analizaron todas las muestras disponibles tipificadas previamente como positivas para VIB correspondientes al período 2010-2014 para diferenciar los linajes B/Victoria y B/Yamagata a través de una RT-PCR en tiempo real (del inglés, rtRT-PCR, “real time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”). La amplificación de la región del gen de la HA fue llevada a cabo con el sistema de RT-PCR en tiempo real de un solo paso Invitrogen SuperScript® III Platinum® de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un termociclador Applied Biosystems® One-Step Plus (Applied Biosystems, EE. UU.) y utilizando unos cebadores específicos provistos por el Centro Colaborador Internacional (CDC, EEUU) a través del programa Internacional de Recursos de Reactivos (IRR, <https://www.internationalreagentresource.org>) (WHO, 2017).

Brevemente, se preparó una mezcla de reacción conteniendo cebadores y sondas apropiadas, y se distribuyeron 20 µL de esta mezcla en cada pocillo de una placa y posteriormente se añadieron 5 µL de cada ARN obtenido. En cada ensayo, se incluyeron controles negativos (utilizando agua en lugar de ácido nucleico) y positivos (extractos de ácidos nucleicos de cepas de referencia) así como un control positivo interno para el gen de la RNAsa P de origen humano. La reacción de rtRT-PCR en un solo paso fue llevada a cabo en un termociclador de Applied Biosystems StepOne Plus (Applied Biosystems, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron las siguientes condiciones: Transcripción reversa por 30 minutos a 50°C, activación de la enzima Taq polimerasa durante 10 minutos a 95°, 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación de los cebadores a 55°C durante 30 segundos. Los resultados se analizaron utilizando el software de Applied Biosystems StepOne Plus versión 2.1. y la interpretación de los resultados se realizó de acuerdo al protocolo estandarizado de la Organización Mundial de la Salud, 2011 (WHO, 2011).

18.3.2. PCR Convencional y electroforesis

Con el fin de secuenciar los genes de las glicoproteínas de superficie HA y NA del VIB, a partir del ARN viral extraído se realizaron dos RT-PCR convencionales. En ambas amplificaciones se utilizaron controles negativos y controles positivos. Posteriormente, los productos de PCR fueron almacenados a -20°C hasta realizarse las corridas electroforéticas.

Para el gen HA, se realizó la amplificación de la región HA1 utilizando el kit comercial SS III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen). Las condiciones de los ensayos y los cebadores utilizados fueron de acuerdo a las recomendaciones de la OMS publicadas en 2017 (WHO, 2017). La mezcla de reacción de 50 µL de volumen final contenía 25 µL de una solución tampón 2X, 1.5 µL de cada cebador de concentración 10 µM, 1 µL de la mezcla de enzimas (Taq ADN polimerasa y Transcriptasa reversa), 15.5 µL de Agua libre de RNAsas y 5 µL de extracto de ARN viral. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador T100 Biorad con las siguientes condiciones: Una transcripción reversa a 42°C durante 30 minutos y 50°C durante 10 minutos, 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, 40 ciclos de (desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores a 50°C durante 2 minutos y extensión a 68°C durante 30 segundos), 1 ciclo de extensión final a 68°C durante 10 minutos.

Para el gen NA, se utilizó un set de cebadores específicos previamente diseñados, con el fin de amplificar una región parcial del gen (a partir del primer nucleótido hasta el nucleótido 1.273 del gen de la NA de VIB). La mezcla de reacción de 50 µL de volumen final contenía 25 µL de una

solución tampón 2X, 1 μ L de cada cebador de concentración 10 μ M (anti-sentido 5' AACACCTGTGACAGTGTCCC3' y sentido 5' CGCATCAAATGTTTCAGGCTG3'), 1 μ L de SuperScript[®] One-Step RT-PCR with Platinum[®]Taq (Invitrogen), 17 μ L de Agua libre de RNAsas y 5 μ L de extracto de ARN viral. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador Biometra con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 50°C durante 30 minutos, 1 ciclo de inicial a 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de (desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación de los cebadores a 54°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 2 segundos), 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X (0,45 M Tris-Borato; 0,001 M EDTA; pH 8.0) utilizando GelRed[™] (Biotium, Hayward, CA, EE.UU.) como agente intercalante de ADN. Se sembraron en cada pocillo 10 μ L de cada producto amplificado con 1.5 μ L del buffer de carga de DNA Loading Buffer Blue (Bioline). Se utilizó como marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), HyperLadder[™] 1kb (Bioline). La visualización de las bandas se realizó con la exposición del gel a luz ultravioleta a través de un transiluminador. El tamaño esperado de las bandas amplificadas con los oligonucleótidos fue de 1.340 pb para HA y 1.218 pb para NA.

18.3.3. Purificación de bandas y secuenciación

Se realizó extracción y purificación de ADN, amplificado por la PCR convencional, a partir de los geles de agarosa utilizando el kit comercial de extracción, PureLink[®] Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR purificados de los genes de HA y NA fueron enviados a secuenciar a Macrogen, Korea y al instituto Pasteur en Montevideo, Uruguay, utilizando los equipos de secuenciación 3730XL y ABI3500 respectivamente (Applied Biosystems, California, EE.UU). Los electroferogramas obtenidos fueron revisados y editados utilizando el programa SeqMan de Lasergene (DNASTAR, Inc, Madison, WI, USA). Luego de la edición, dichas secuencias consenso fueron analizadas con BLAST GenBank (Benson et al. 2018) y fueron nombradas como B/Uruguay seguida por el número identificador de la muestra y el año de la toma.

18.3.4. Datos de secuencias y análisis filogenéticos de los genes HA y NA de VIB

Las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la edición con el programa SeqMan (DNASTAR, Inc, Madison, WI, USA), fueron alineadas utilizando el método iterativo Muscle (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) y analizadas filogenéticamente utilizando el programa MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) por métodos basados en distancia y calculadas según el algoritmo de Kimura dos parámetros como modelo de sustitución nucleotídica (Kimura 1980). Además de las muestras mencionadas anteriormente, para los análisis filogenéticos de ambos genes se incluyeron cepas del VIB aisladas en el país y en la región durante el año 2010.

Además de las secuencias obtenidas en este estudio, se descargaron e incluyeron en los análisis filogenéticos otras secuencias de Uruguay y de los países de la región (Argentina, Brasil, Chile y Paraguay) que se encuentran disponibles en la base de datos GISAID y que pertenecen al período 2010-2019. Fueron incluidas también las cepas vacunales recomendadas por la OMS para el Hemisferio Sur entre los años 2010 al 2019 inclusive (WHO, 2020). Las secuencias de nucleótidos de los genes parciales HA y NA de VIB obtenidas en Uruguay se depositaron en la base de datos GISAID (www.gisaid.org), los números de acceso para las secuencias uruguayas obtenidas en este estudio se encuentran en el Anexo 1.

Con un conjunto de datos de alrededor de cien secuencias para cada gen, se generaron árboles filogenéticos utilizando el algoritmo del “vecino más próximo” (neighbor-joining en inglés), el cual es un método con una buena aproximación heurística para encontrar el mejor árbol realizando búsquedas secuenciales de los vecinos. Como soporte del análisis filogenético se utilizó el bootstrap; se fijó el valor en 1.000 réplicas con lo que el software realizó muestreos aleatorios con reemplazo a partir de dicho parámetro, revelando al final del análisis una filogenia consenso con un valor porcentual que indica la cantidad de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas. Se consideraron valores de bootstrap por encima del 70% (Felsenstein 1985). Para la visualización y la edición de los árboles filogenéticos, se utilizó el programa FigTree versión 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

18.3.5. Variaciones en secuencias aminoacídicas y sitios de glicosilación

Las variaciones en las secuencias aminoacídicas y los sitios de glicosilación fueron obtenidos a partir de la edición de las secuencias nucleotídicas obtenidas para los linajes B/Victoria y B/Yamagata utilizando como referencia las cepas vacunales *B/Brisbane/60/2008* y *B/Phuket/3073/2012* respectivamente. Para este fin se utilizaron los programas Aminoacid difference (aadiff) y Glycosylation Site Calculator (gs) que se encuentran dentro del paquete informático que provee la OMS a los CNIs.

19. Resultados

19.1. Detección molecular de los VIB circulantes en Uruguay

Para identificar el linaje del VIB, se analizaron 226 muestras de cepas que circularon en Uruguay durante el período comprendido entre los años 2012 y 2019, para estos análisis también se incluyeron algunas secuencias que fueron obtenidas de cepas que circularon en el año 2010 en Uruguay. El subtipo de VIB se reveló utilizando la técnica rtRT-PCR detectándose 114 muestras pertenecientes al linaje B/Victoria y 103 muestras al linaje B/Yamagata. Las 9 muestras restantes no pudieron subtipificarse. Se seleccionaron al azar 45 muestras para realizar los análisis genéticos y filogenéticos de las dos glicoproteínas HA y NA.

19.1.1. Análisis Filogenético. Gen HA

De las muestras seleccionadas, se obtuvieron 42/45 secuencias completas de la región HA1 del gen HA y para los análisis filogenéticos se incluyeron 31 secuencias adicionales de cepas uruguayas que se encuentran en la base de datos GISAID. Por lo tanto, para estos análisis se trabajó con un set total de 73 secuencias de la región HA1 de las cuales 38 pertenecían al linaje B/Victoria y 35 al linaje B/Yamagata.

Los análisis filogenéticos para la región HA1 del gen HA muestran que las cepas del linaje B/Victoria que circularon en Uruguay a partir del año 2012 se clasificaron principalmente en el clado 1A cuya cepa representativa es la *B/Florida/78/2015*. Por otro lado, las secuencias obtenidas de muestras del año 2010 indican que el clado circulante de B/Victoria fue el 1B representado por la cepa de referencia *B/Montana/05/2012*. Las muestras de Uruguay correspondientes al año 2010 pertenecieron al clado 1B y se agruparon con otras cepas aisladas en los países de la región también ese mismo año y a la cepa de referencia *B/Montana/05/2012*. Posterior al año 2010, cepas de este clado no volvieron a circular en el país. Por otro lado, tanto las cepas del clado 1A que circularon del 2012 al 2017 y también en el año 2019 se agruparon con cepas de países de la región y con la cepa *B/Brisbane/60/2008* utilizada en las recomendaciones vacunales de los años 2010, 2011, 2012, 2016 y 2017. Además las cepas que circularon en Uruguay y en la región a partir del año 2015 se agruparon con las vacunales *B/Colorado/06/2017* y *B/Washington/02/2019* ambas pertenecientes al clado 1A que fueron recomendadas para ser utilizadas en las vacunas de los años 2019 y 2020 respectivamente. En el año 2018 a diferencia de otros países de la región, no hubo circulación de B/Victoria en Uruguay. En la parte superior del árbol filogenético que se muestra en la Figura 13, se puede observar el sub-clado 1A1 en el cual se agrupan junto con la vacunal *B/Colorado/06/2017* las cepas que circularon en la región en los años 2017 y 2018 y las cepas aisladas en el año 2019 tanto en Uruguay como en la región. Este sub-clado tiene la particularidad de tener dos deleciones en las posiciones 162 y 163 en la región HA1 de la HA además de otras mutaciones. Todo este sub-clado 1A1 está muy relacionado con la cepa vacunal *B/Washington/02/2019* sugerida para el año 2020 que contiene una triple mutación en la región HA1 de la HA en las posiciones 162 a 164. Si bien las muestras del linaje B/Victoria que circularon en el año 2017 en Uruguay no presentan estas deleciones y mutaciones y se agrupan en un sub-clado separado también están relacionadas genéticamente con las vacunales *B/Colorado/06/2017* y *B/Washington/02/2019*. (Figura 10).

Los análisis filogenéticos para la región HA1 del gen HA muestran que las cepas del linaje B/Yamagata que circularon en Uruguay se clasifican en los clados 2 y 3. Las muestras del linaje B/Yamagata que circularon en el país y las cepas seleccionadas de países de la región de los años 2010, 2014, 2015, 2017, 2018 y 2019 se agruparon en el clado 3 junto con

B/Wisconsin/01/2010 y *B/Phuket/3073/2013* recomendadas como candidatas vacunales en el año 2013 y en los años 2015 y 2018 respectivamente. Por otro lado, las muestras del linaje B/Yamagata que circularon en el año 2012 en Uruguay, se agruparon en el clado 2 junto a otras cepas de países de la región del mismo año y años posteriores y también junto a la cepa *B/Massachusetts/02/2012* utilizada en la vacuna recomendada para el año 2014. Desde entonces no se ha detectado la circulación del clado 2 en Uruguay. Dentro del clado 3 de la filogenia de la región HA1 de B/Yamagata se observa también una separación entre las cepas que circularon en Uruguay en el año 2010 que se agrupan en un sub-clado junto a otras cepas de países de la región del mismo año y de años posteriores; y las cepas que circularon en el país desde el 2014 al 2018 que se agrupan en otro sub-clado y que se encuentran más estrechamente relacionadas con otras cepas aisladas en los mismos años. En la parte superior del árbol se encuentran las cepas del linaje B/Yamagata que circularon a partir del año 2017 separados también en dos sub-clados. Las cepas de Uruguay del linaje B/Yamagata del año 2017 se encuentran agrupadas en un sub-clado dentro del clado 3 junto a cepas de otros países de la región mientras que las cepas que circularon en el país en el año 2018 se agruparon en otro sub-clado junto con secuencias de la región que circularon en los años 2018 y 2019. En el año 2019 circuló en Uruguay muy pocas cepas de este linaje que no pudieron ser amplificadas para estos estudios. (Figura 11).

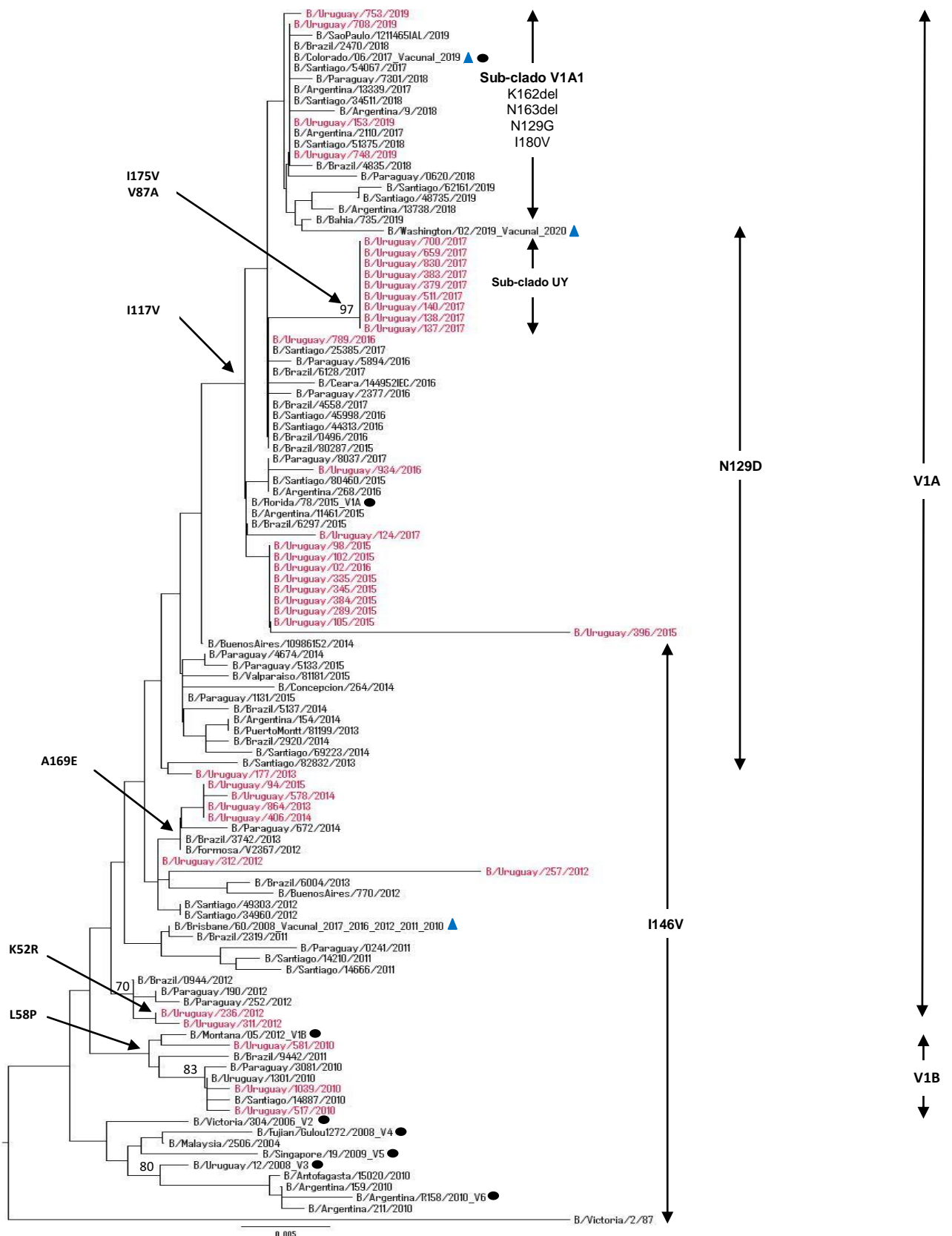


Figura 10. Análisis filogenético de la región HA1 del gen HA de las cepas B/Victoria aisladas en Uruguay durante el período 2010 a 2019. Las relaciones filogenéticas se construyeron aplicando el método de distancia Neighbor-Joining y utilizando el método de Kimura 2-parámetros como modelo de sustitución nucleotídica aplicando un bootstrap de 1000 réplicas. Se indican los valores de bootstrap por encima de 70%. Las cepas aisladas en Uruguay se indican en rojo. Con un triángulo azul se indican las cepas vacunales mientras que las cepas representativas de clado y sub-clado se indican con un círculo negro como símbolo. Se indican con flechas las mutaciones más relevantes encontradas. La escala representa la cantidad de sustituciones por sitio.

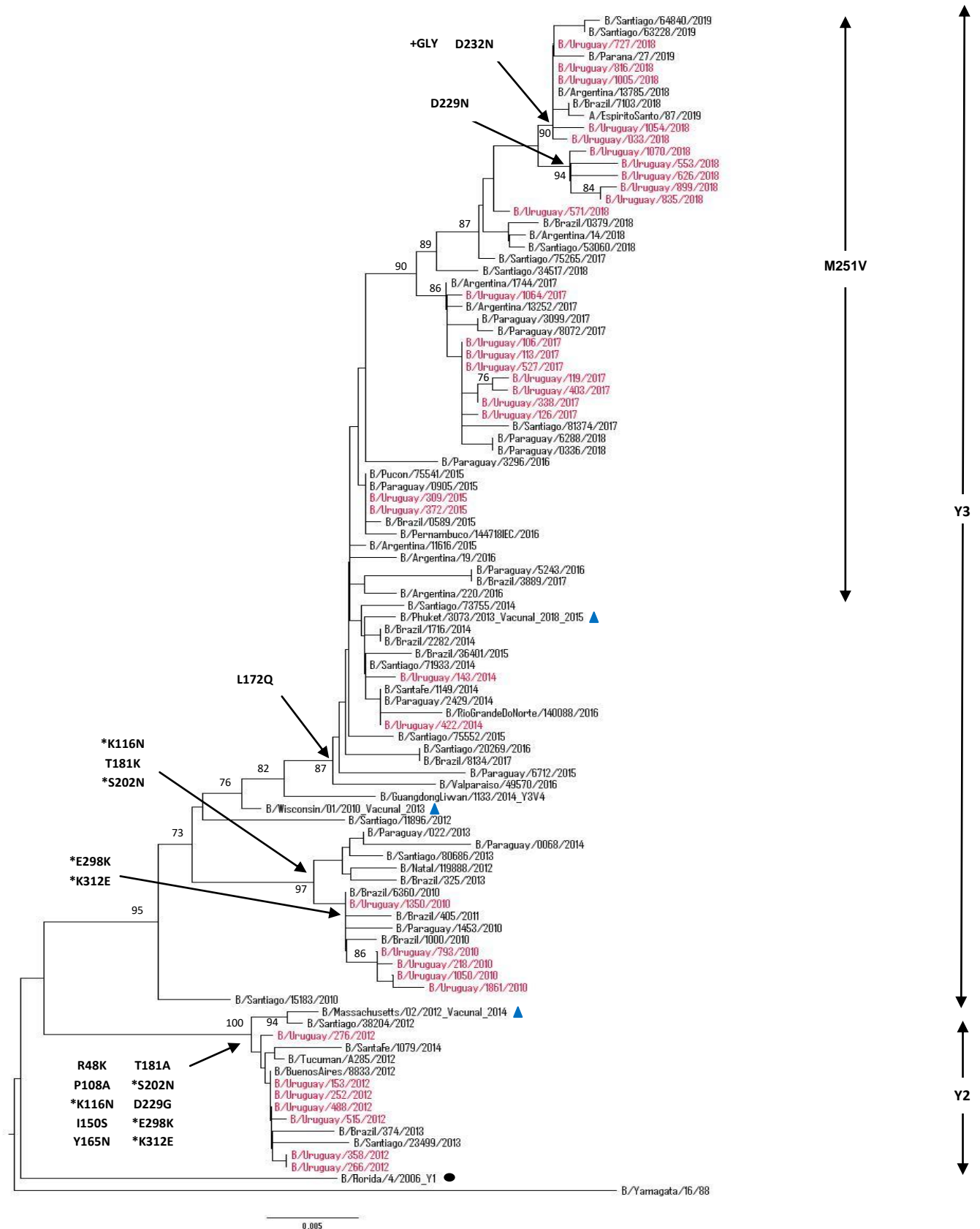


Figura 11. Análisis filogenético de la región HA1 del gen HA de las cepas B/Yamagata aisladas en Uruguay durante el período 2010 a 2019. Las relaciones filogenéticas se construyeron aplicando el método de distancia Neighbor-Joining y utilizando el método de Kimura 2-parámetros como modelo de sustitución nucleotídica aplicando un bootstrap de 1000 réplicas. Se indican los valores de bootstrap por encima de 70%. Las cepas aisladas en Uruguay se indican en rojo. Con un triángulo azul se indican las cepas vacunales mientras que las cepas representativas de clado se indican con un círculo negro como símbolo. Con símbolo "*" se marcan las mutaciones compartidas por ambos clados de B/Yamagata. Se indican con flechas las mutaciones más relevantes encontradas. La abreviatura "Gly" indica que es un sitio de glicosilación. La escala representa la cantidad de sustituciones por sitio.

19.1.2. Análisis filogenéticos. Gen NA

De las muestras seleccionadas, se obtuvieron 32 secuencias parciales del gen de la NA y para los análisis filogenéticos se incluyeron 28 secuencias adicionales de cepas uruguayas que se encuentran en la base de datos GISAID. Por lo tanto, para estos análisis se trabajó con un set total de 60 secuencias parciales del gen de la NA de las cuales 29 pertenecían al linaje B/Victoria y 31 al linaje B/Yamagata.

En la filogenia del gen NA de las cepas del linaje B/Victoria no se observa tan clara la distinción de clados como para la región HA1 del gen HA. Las cepas del linaje B/Victoria que circularon en el año 2010 en Uruguay se agrupan juntas dentro del clado 1 con otras cepas de la región aisladas ese mismo año mientras que otras cepas de países de la región del año 2010 se agruparon en el clado 6. En los años 2012, 2013, 2014 y 2016 circularon en Uruguay muy pocas cepas pertenecientes a B/Victoria que también se agruparon dentro del clado 1 junto con otras cepas seleccionadas de la región mientras que las cepas que circularon en el año 2015 en el país se agruparon en el mismo clado 1 todas juntas. Hacia la parte superior del árbol filogenético se encuentran los aislados del año 2017, y al igual que lo observado para el gen HA, estas cepas formaron un sub-clado separado dentro del clado 1 de B/Victoria. Si bien las muestras del linaje B/Victoria que circularon en el año 2017 en Uruguay no presentan estas deleciones y mutaciones y se agrupan en un clado separado también están relacionadas genéticamente con las vacunales *B/Colorado/06/2017* y *B/Washington/02/2019*. En la parte superior del árbol filogenético se observa, al igual que en el gen HA, el sub-clado 1A1 en el que se encuentran agrupadas las cepas de Uruguay que circularon en el año 2019 y las cepas de la región que circularon del año 2017 al 2019 junto con la cepa vacunal *B/Colorado/06/2017*. Durante el año 2018 no se detectó circulación en el país. (Figura 12)

En cuanto a la filogenia del gen NA del linaje B/Yamagata, se observa una separación entre las cepas de Uruguay que circularon en el año 2012 agrupadas en el clado 2 y el resto de los aislados en el país durante los años 2010, 2014, 2015, 2017 y 2018 que se agruparon dentro del clado 3. Durante el año 2013 el 100% de las muestras subtipificadas pertenecieron al linaje B/Victoria. Las cepas detectadas en el año 2012 en Uruguay se agrupan todas con la mayoría de las cepas de países de la región para ese año y los años 2013 y 2014 y todas están relacionadas con la cepa vacunal *B/Massachusetts/02/2012* utilizada en el hemisferio sur en el año 2014. Las cepas del linaje B/Yamagata que circularon en el país durante el año 2010 se agrupan en un sub-clado separado dentro del clado 3 por lo que están relacionadas genéticamente con las cepas vacunales *B/Wisconsin/1/2010* y *B/Phuket/3073/2013*. Las cepas de B/Yamagata que circularon en los años 2014 y 2015 se encuentran cercanas entre sí en el árbol y agrupadas con otras cepas de la región de los años 2014 al 2016. Hacia la parte superior del árbol se encuentran las cepas aisladas en el país durante el 2017 agrupadas formando un sub-clado dentro del clado 3, todo este sub-clado está muy relacionado con otro sub-clado formado al final del árbol en el cuál están agrupadas las cepas de Uruguay que circularon en 2018 junto con cepas de la región aisladas en los años 2018 y 2019. En el año 2019 se detectaron muy pocas cepas de este linaje que no pudieron determinarse a qué clado pertenecían. (Figura 13)

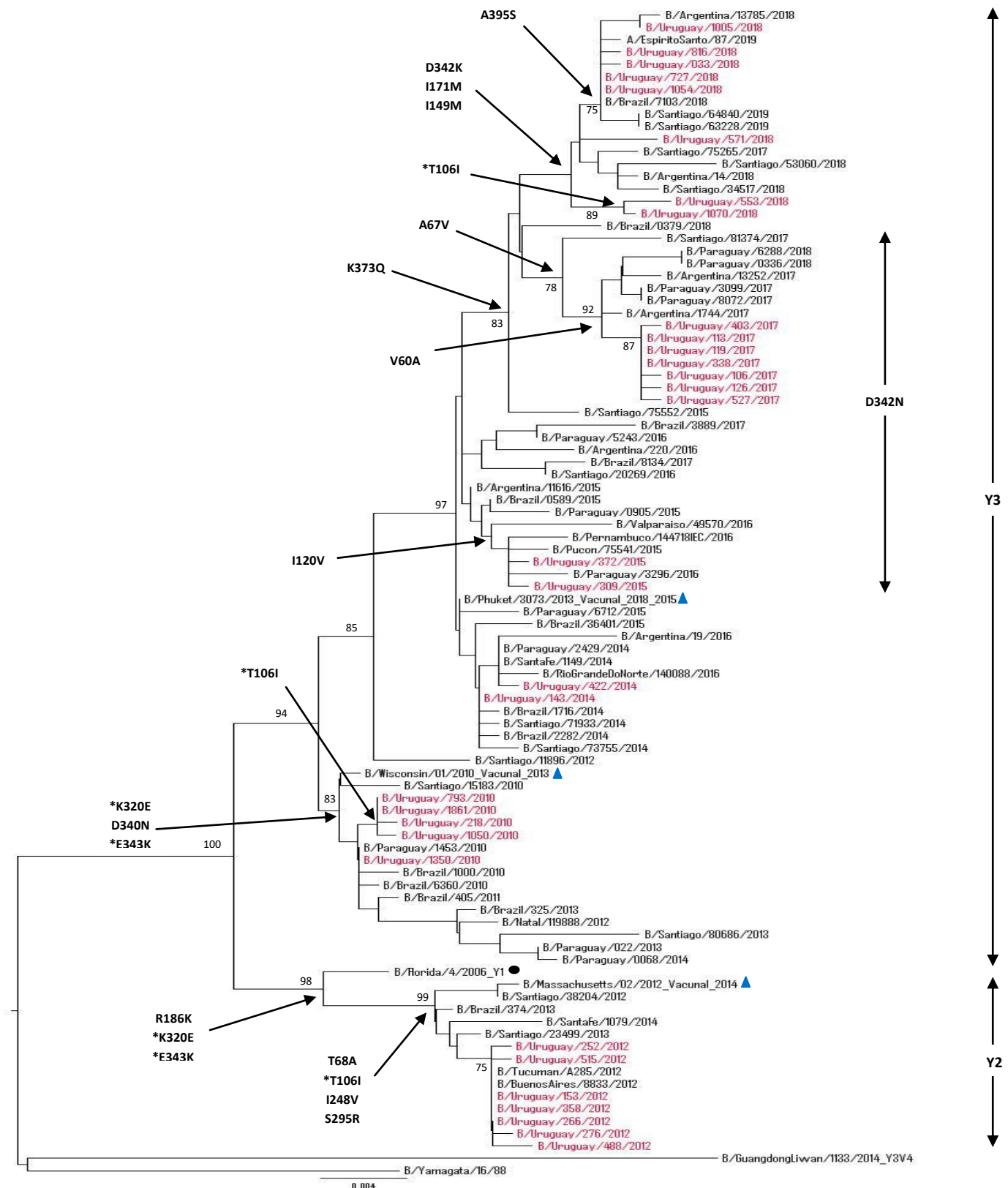


Figura 13. Análisis filogenético de una región parcial del gen NA de las cepas del VIB del linaje B/Yamagata aisladas en Uruguay durante el período 2010 a 2019. Las relaciones filogenéticas se construyeron aplicando el método de distancia Neighbor-Joining y utilizando el método de Kimura 2-parámetros como modelo de sustitución nucleotídica aplicando un bootstrap de 1000 réplicas. Se indican los valores de bootstrap por encima de 70%. Las cepas aisladas en Uruguay se indican en rojo. Con un triángulo azul se indican las cepas vacunales mientras que las cepas representativas de clado se indican con un círculo negro como símbolo. Con símbolo "*" se marcan las mutaciones compartidas por ambos clados de B/Yamagata. Se indican con flechas las mutaciones más relevantes encontradas. La escala representa la cantidad de sustituciones por sitio.

19.2. Sustitución de aminoácidos en la región HA1

En líneas generales se observa que las mutaciones aminoacídicas encontradas en la región HA1 de la HA de los VIB circulantes durante el período 2010 a 2019 son específicas de linaje y que las mutaciones encontradas en B/Victoria no se encuentran en B/Yamagata y viceversa. En todas las secuencias de Uruguay analizadas para el linaje B/Yamagata se encontraron 17 sitios con 20 mutaciones diferentes, ocho sitios de esos presentaron más variaciones (116, 172, 181, 202, 229, 251, 298 y 312) tanto en el país como en las secuencias de la región, quedando destacados los sitios 172 y 251 por sobre el resto. En las secuencias analizadas del linaje B/Victoria se encontraron 16 sitios con variaciones pero en este caso fueron 3 sitios (117, 129 y 146) los que acumularon el mayor número de mutaciones tanto para Uruguay como para las cepas seleccionadas de la región. Además se encontraron sólo en las cepas B/Victoria de Uruguay dos sitios (87 y 175) con más mutaciones luego de las mencionadas anteriormente. (Tabla 1 y Anexos 2, 3, 6 y 7).

En dos cepas del linaje B/Victoria se encontraron once mutaciones puntuales en la región HA1 de la HA, para la cepa B/Uruguay/396/2015 (N129D, E358K, E362K, G363R, G367S, T372P, H374Q, G378A, S387N, T388P, E390R) y para la cepa B/Uruguay/257/2012 (P144L, I146V, T372P, H374Q, V379I, A380T, A382G, K386R, S387N, T388P, E390K). Estas diferencias pueden ser visualizadas en el árbol filogenético (Figura 10) y no fueron incluidas en los análisis genéticos.

Los análisis de los sitios antigénicos en las cepas de Uruguay revelan mutaciones en todos los sitios para los virus de linaje B/Yamagata y en las regiones del bucle-120, del bucle-150 y del bucle-160 en los virus de linaje B/Victoria. Se destaca que durante todo el período estudiado se encontraron en las secuencias uruguayas más mutaciones en el linaje B/Victoria (65/99, 65.7%) para estos sitios que en linaje B/Yamagata (41/154, 26.6%). Para B/Yamagata las cantidades de mutaciones encontradas en los sitios antigénicos fueron casi parejas destacándose el bucle-120 y la región de la hélice-190, en cuanto a B/Victoria la región del bucle-120 acumuló el mayor número de mutaciones para todo el período. Considerando ambos linajes y de lo observado para el período 2010-2019, la región del bucle-120 fue la zona con más variabilidad en VIB seguida del bucle-150, el bucle-160 y finalmente la hélice-190. (Tabla 1).

Por otro lado, para el linaje B/Yamagata las mutaciones en la región del bucle-120 ocurrieron en los años 2010 y 2012, en la región del bucle-150 preferentemente en el año 2012 y se encontró una mutación en el año 2018, en la región del bucle-160 también se encontró en el año 2012 y finalmente las mutaciones en la región de la hélice-190 fueron encontradas en los años 2010 y 2012. Se observa también que mutaciones en años más recientes del período estudiado se dan en otros residuos aminoacídicos como ser la mutación L172Q fijada desde el año 2014 y la mutación M251V fijada desde el 2015. Mientras que para el linaje B/Victoria se encontraron mutaciones en la región del bucle-150 en los años 2010 hasta diluirse en el año 2015, en la región del bucle-120 se encontraron mutaciones a partir del 2015, y en la región del bucle-160 fueron detectadas mutaciones en el año 2019. Las mutaciones más prevalentes en cada sitio antigénico para B/Yamagata fueron K116N en el bucle-120, I150S en el bucle-150, Y165N en el bucle-160 y S202N en hélice-190, mientras que para el linaje B/Victoria fueron la N129D en el bucle-120, I146V en el bucle-150 y del162-del163 en el bucle-160. (Tabla 1).

B/Yamagata								
HA1	Mutación	# mut	2010	2012	2014	2015	2017	2018
	R48K	7	7
	I83V	1	.	.	1	.	.	.
	P108A	7	.	7
b-120	K116N	12	6	6
	V124A	1	.	1
b-150	I150V	1	1
b-150	I150S	7	.	7
b-160	Y165N	7	.	7
	L172Q	23	.	.	2	2	8	11
	T181A	7	.	7
	T181K	5	5
	T188A	1	1
h-190	T198I	1	1
h-190	S202N	12	7	5
	D229N	5	5
	D229G	7	.	7
	D232N	5	5
	M251V	21	.	.	.	2	8	11
	E298K	12	6	6
	K312E	12	6	6
	# mut por año	8	10	2	2	2	2	5

B/Victoria										
HA1	Mutación	# mut	2010	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2019
	K52R	2	.	2
	L58P	4	4
	V87A	9	9	.
	Q106R	1	1	.	.	.
b-120	I117V	15	2	10	3
b-120	T121N	1	1	.	.
b-120	N129G	4	4
b-120	N129D	22	.	.	1	.	8	3	10	.
b-150	P144L	1	.	1
b-150	I146V	13	4	4	2	2	1	.	.	.
b-160	del162	4	4
b-160	del163	4	4
b-160	D164E	1	1
	A169E	4	.	.	1	2	1	.	.	.
	I175V	9	9
	I180V	4	4
	V252M	1	1	.	.
	# mut por año	3	4	3	2	4	5	5	5	7

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos en epítopes antigénicos y otras regiones de HA1 para los linajes B/Victoria y B/Yamagata encontradas en el período 2010-2019. Se muestran los totales de sustituciones aminoacídicas encontradas en los epítopes antigénicos y en otras regiones circundantes de la región HA1 de la HA discriminadas por linaje y por año y obtenidas por comparación con la cepa vacunal *B/Brisbane/60/2008* para el linaje B/Victoria y con cepa vacunal *B/Phuket/3073/2013* para el linaje B/Yamagata. Las posiciones de los aminoácidos en los epítopes antigénicos están de acuerdo según (Ni et al. 2013). Las abreviaturas b-120, b-150, b-160 y h-190 corresponden a los sitios antigénicos bucle-120, bucle-150, bucle-160 y hélice-190 encontrados en la región HA1 respectivamente. En color azul se destacan los sitios más prevalentes encontrados para cada linaje y en verde se destacan las mutaciones únicas encontradas en las cepas de Uruguay.

Se compararon las secuencias de aminoácidos en la región HA1 de la HA de las cepas del linaje B/Victoria que circularon en el país y en la región durante el período 2010 a 2019 con la cepa vacunal *B/Brisbane/60/2008*. Dentro de los cambios encontrados se destacan los siguientes:

L58P: este cambio se detectó únicamente en el año 2010 en todas las cepas estudiadas de Uruguay y en otras dos secuencias de países de la región. Este cambio es específico y define al subclado 1B.

I146V: este cambio se detectó en Uruguay y en los países de la región desde el año 2010 hasta principios de la temporada del 2015.

N129D: comienza circulando en el año 2013 en Uruguay y en países de la región hasta el año 2017 en donde cambia a **N129G** para circular en países de la región en 2018 y 2019 y en Uruguay en el año 2019 debido a que en 2018 no hubo circulación de B/Victoria en el país.

I117V: este cambio comienza a circular en la región en el año 2015 hasta el 2019 inclusive, en Uruguay comienza a circular en agosto de 2016 como también en las temporadas 2017 y 2019, en el año 2018 no hubo circulación de este linaje. Tanto este cambio como el N129G definen al clado V1A de los virus B/Victoria.

V87A y **I175V:** son cambios que fueron encontrados únicamente en cepas circulantes en Uruguay durante el año 2017 y que se encuentran definiendo un sub-clado dentro de V1A. Estos cambios no fueron detectados en el país o en la región durante el resto de las temporadas estudiadas.

I180V, K162del, N163del: En los países de la región, en algunas cepas del año 2017 y en las cepas que circularon en los años 2018 y 2019 se detectaron dos delecciones de aminoácidos en dos sitios contiguos, **K162del** y la **N163del**. Todas estas cepas también presentaron la mutación **I180V**. Estas tres modificaciones junto con el cambio **N129G** son los que definen al nuevo subclado 1A1 dentro del clado 1A y en el cual también está comprendida la cepa vacunal a utilizar en el año 2019 *B/Colorado/06/2017* (Francis Crick Institute, 2019). Con respecto a nuestro país, se encontraron los cuatro cambios que definen al sub-clado 1A1 en las cepas que circularon en el año 2019.

Por otro lado, se compararon las secuencias de aminoácidos en la región HA1 de la HA de las cepas del linaje B/Yamagata que circularon en el país y en la región durante el período 2010 a 2019 con la cepa vacunal *B/Phuket/3073/2013*. Dentro de los cambios encontrados se destacan los siguientes:

Las cepas de Uruguay y de la región del año 2012 compartieron todas 10 mutaciones: **R48K, P108A, K116N, I150S, Y165N, T181A, S202N, D229G, E398K y K312E**. La gran cantidad de variaciones se debe a que estas cepas pertenecen al clado 2 y el análisis se realizó con la vacunal que pertenece al clado 3. Las cepas del clado 2 que circularon en el país comparten los cambios K116N, S202N, E298K y K312E con las cepas del clado 3 del linaje B/Yamagata que circularon en el 2010. Por otro lado, en las cepas del clado 3 que circularon en 2010 se encontró que la mutación T181K difiere con la variante encontrada en esa posición para las muestras del clado 2. En el resto del período en estudio no se detectaron cepas del clado 2.

L172Q esta mutación se encontró en todas las muestras pertenecientes al clado 3 que circularon en Uruguay y en la región a partir del 2014 hasta el 2018 inclusive, mientras que el cambio **M251V** también fue encontrada en todas las cepas que circularon en Uruguay y en la región pero a partir del 2015 al 2018 inclusive.

D229N es un cambio que se encuentra en algunas de las cepas que circularon en Uruguay durante el 2018 y forman formando un sub-clado separado dentro del clado 3. Por otro lado, la mutación **D232N** está presente en el resto de las cepas que circularon en el país ese año como también con algunas cepas de la región que circularon en 2018 y 2019, también todas estas cepas forman un sub-clado aparte dentro del clado 3. Curiosamente, las cepas de Uruguay contenidas en este segundo sub-clado pertenecen únicamente a pacientes ambulatorios. La excepción de los cepas de Uruguay en el año 2018, es la cepa *B/Uruguay/571/2018* que si bien se agrupa con el resto de las secuencias en ese año compartiendo las mutaciones L172Q y M251V no presenta D229N ni D232N. En el año 2019 casi ni se detectó la circulación del linaje B/Yamagata en el país.

19.2.1. Sitio unión al receptor y sitios de glicosilación

No se encontraron mutaciones en el sitio catalítico de la HA en las cepas del linaje B/Victoria mientras que para el linaje B/Yamagata se encontraron dos mutaciones en la región de la hélice-190, la mutación S202N en cepas aisladas en los años 2010 y 2012 y la mutación T198I encontrada en un aislado del año 2010 (Tabla 1 y Anexos 2, 3, 6 y 7).

En cuanto a los sitios de glicosilación, para el linaje B/Victoria no se encontraron diferencias en los posibles sitios de la región HA1 del gen HA. En todas las cepas de Uruguay y en la mayoría de las cepas de la región se encontraron 8 sitios posibles para este linaje: 25, 59, 145, 166, 197, 233, 304 y 333 (Anexo 10). Las cepas del linaje B/Yamagata comparten 7 posibles sitios de glicosilación en las posiciones 25, 59, 145, 167, 196, 303 y 332 del segmento HA1 (Anexo 11). Sólo dos cepas del año 2010, una aislada en Uruguay y otra de las seleccionadas de Paraguay

presentan 6 sitios posibles de glicosilación faltándoles el sitio en la posición 196. Cinco de las once cepas B/Yamagata que circularon en el país durante el año 2018, además de ser de pacientes ambulatorios, contienen un nuevo sitio potencial de glicosilación en la posición 232 que no está presente en la cepa vacunal utilizada en el año 2018. Sumado a que estas cepas contienen la mutación D232N en ese sitio (Figura 13 y Anexos 3, 7 y 11).

19.3. Sustitución de aminoácidos en la NA

Si bien se observan mutaciones en el gen parcial de la NA que no son compartidos por ambos linajes, como ocurría para la región HA1, se encontraron mutaciones y sitios que son compartidos. También se observa que las secuencias nucleotídicas de NA de ambos linajes presentan un mayor número de mutaciones que las secuencias de la región HA1.

Para el período 2010 a 2019, los análisis de la NA sugieren que las cepas aisladas de los dos linajes de VIB en Uruguay compartieron no sólo mutaciones N59K, T68A, T106I, I120V y S295R sino también los sitios 45, 46, 73, 106, 320, 340, 371 y 395 dónde se encontraron diferentes mutaciones en los dos linajes (Tabla 2). Como regla general, salvo para N59K, las mutaciones que fueron compartidas no circularon en simultáneo.

Del análisis se observa que las cepas que circularon en los últimos años del período acumularon un mayor número de mutaciones en las secuencias de NA, la excepción es el año 2010 para el linaje B/Victoria y el año 2012 para el linaje B/Yamagata. A pesar de casi presentar la misma cantidad de cambios en la NA, se observa que las mutaciones en este gen para B/Yamagata están más diseminadas a lo largo de la secuencia aminoacídica en comparación al linaje B/Victoria que acumularon mayor número de cambios desde la posición 120 a la 384 inclusive. Ninguno de los cambios encontrados en todo el período estudiado se ubicaron en los residuos catalíticos o en los sitios de alrededor de la glicoproteína NA. (Tabla 2. Anexos 4 y 5).

A pesar de que las secuencias de la NA de ambos linajes de VIB comparten mutaciones y sitios, las mutaciones más prevalentes en B/Victoria (I120V, K220N, S295R, N340D, E348K y D384G) fueron diferentes a las encontradas en el linaje B/Yamagata (P73L, T106I, K320E, D342K, D342N, E343K y K373Q) en todo el período estudiado. Sin embargo, dos de estas mutaciones prevalentes (I120V y T106I) fueron detectadas en el otro linaje en años diferentes. Aunque la mutación I120V en B/Victoria es una de las más prevalentes y fue detectada en los años 2016, 2017 y 2019, esa misma mutación fue encontrada en el año 2015 pero en un número menor en el linaje B/Yamagata. También se observa que la mutación T106I en el linaje B/Yamagata, una de las más prevalente, fue detectada en los años 2010, 2012 y en menor número en 2018 mientras que también fue detectada en todas las cepas analizadas del linaje B/Victoria que circularon en el año 2017.

En el linaje B/Victoria, se encontraron únicamente en las cepas de Uruguay que circularon en el año 2017 las mutaciones T68A, T106I y V401I. Sin embargo, el cambio T68A también fue encontrado en las cepas del linaje B/Yamagata que circularon en el 2012.

Una forma de deducir que ocurrieron eventos de reordenamiento es observando los árboles filogenéticos para el gen NA, las cepas deberían clasificar en un linaje diferente a su HA para estar en presencia de reordenamientos. No se observaron reordenamientos en ninguna de las cepas aisladas y analizadas durante el período 2010 a 2019 (Figuras 10, 11, 12, 13).

B/Victoria										B/Yamagata									
NA	Mutación	# mut p sitio	2010	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2019	NA	Mutación	# mut p sitio	2010	2012	2014	2015	2017	2018
	S27L	2	2		R42Q	2	.	.	2	.	.	.
+	I45T	3	2	1	.	.	+	V45I	3	1	2
+	T46I	3	2	1	.	.	+	T46N	1	.	.	1	.	.	.
	P51S	3	3		I49M	3	3
*	N59K	1	1	.	.	.		D53G	1	1
	V60I	1	1	.		A55T	2	.	2
*	T68A	9	9	.		A57R	1	.	.	.	1	.	.
+	L73F	5	3	.	.	2	*	N59K	2	.	1	.	1	.	.
	L74I	1	1	.		V60A	7	7	.
	L75F	1	1	.		V60F	1	.	.	.	1	.	.
	K94R	3	3		V60N	1	.	1
*	T106I	9	9	.		V60C	1	1
+	T106A	1	1		A67V	7	7	.
*	I120V	13	1	9	3	*	T68A	7	.	7	.	.	.
	I157V	1	1	.	.	+	P73L	12	5	7
	N198S	2	2	.	.	.		P76Q	1	1
	N199D	4	4		P78S	1	.	.	.	1	.	.
	K220N	13	1	9	3		P88L	1	.	1	.	.	.
	A290V	1	1	.	.		T91I	1	.	.	1	.	.	.
*	S295R	23	.	.	1	2	6	2	10	3		S99N	1	1	.
+	D320N	1	1	*	T106I	13	4	7	.	.	.	2
	N329D	4	4		I115M	1	1	.
+	N340D	25	.	1	1	2	6	2	10	3	*	I120V	2	.	.	.	2	.	.
	S345N	3	.	.	.	2	.	.	1	.		K125T	7	.	7
	E358K	24	.	.	1	2	6	2	10	3		I171M	8	8
+	K371Q	3	3		A175T	3	1	1	.	1	.	.
	M377K	1	1		R186K	8	.	7	.	.	.	1
	D384G	13	1	9	3		I248V	7	.	7	.	.	.
+	A395D	3	3	*	S295R	7	.	7
+	A395V	1	1	+	K320E	12	5	7
	V401I	9	9	.	+	D340N	5	5
	M403I	1	1	.	.		D342K	8	8
	# mut por año	10	1	3	6	7	11	12	8		D342N	9	.	.	.	2	7	.	
											E343K	12	5	7
											+	K371R	1	1
												T372N	1	1	
												K373Q	15	7	8
											+	A395S	5	5
												# mut por año	9	15	3	7	6	10	

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos en el gen de NA para los linajes B/Victoria y B/Yamagata encontradas en el período 2010-2019 en Uruguay. Se muestran las sustituciones aminoacídicas encontradas en el gen parcial de NA discriminadas por año y por linaje obtenidas por comparación con la vacunal B/Brisbane/60/2008 para B/Victoria y con B/Pucket/3073/2012 para el linaje B/Yamagata. En color azul se destacan los sitios más prevalentes y en verde se destacan las mutaciones únicas encontradas en las cepas de Uruguay. Se marcan en con símbolo “*” aquellas mutaciones que son compartidas por ambos linajes y con símbolo “+” las posiciones que son compartidas por los dos linajes y que contienen diferentes mutaciones. La abreviación “# mut p sitio” detalla la cantidad de mutaciones por sitio encontradas en todo el período de estudio y la abreviación “# mut por año” indica la cantidad de mutaciones que ocurrieron para determinado año del período.

Se compararon las secuencias de aminoácidos en la región parcial del gen NA de las cepas del linaje B/Victoria que circularon en el país y en la región durante el período 2010 a 2019 con la cepa vacunal B/Brisbane/60/2008. Dentro de los cambios encontrados se destacan los siguientes: Las cepas aisladas en Uruguay y algunas de la región en el año 2010 contienen las mutaciones **N329D** y **N199D**, hay otras mutaciones que no están presentes en todas las cepas aisladas en el

país como ser la P51S, la L73F o la K94R. De estas tres últimas mutaciones solo la L73F fue encontrada en los aislados del año 2014 en el país.

A partir de las muestras aisladas en Uruguay y la región en el año 2012 hasta el final del período estudiado en el año 2019, todas las cepas consideradas presentaron la mutación **N340D**. Además desde el año 2014 hasta el 2019 inclusive, todas las cepas estudiadas del país y la región presentaron las mutaciones **S295R**, **E358K**. El año 2018 fue el único en el cual no circularon cepas del linaje B/Victoria en Uruguay pero sí circuló en la región.

Desde el año 2016 hasta el 2019, a excepción del año 2018 para Uruguay, todas las cepas aisladas en el país y la región contenían las mutaciones **I120V**, **K220N** y **D384G**. Dentro de este grupo y hacia el final del árbol filogenético hay dos sub-clados diferenciados, uno es el que contiene a las cepas que circularon en Uruguay en el año 2017 y que presentaron los cambios **T88A**, **T106I**, **V401I** y el segundo sub-clado contiene a las cepas aisladas en la región desde el año 2017 al 2019 como también las cepas que circularon en el país en el año 2019 todas ellas comparten la mutación **K371Q**. Además, dentro de este segundo sub-clado se encuentra otra agrupación de cepas conteniendo a las de Uruguay que todas ellas presentan la mutación **A395D**.

Por otro lado, se compararon las secuencias de aminoácidos en la región parcial de la NA de las cepas del linaje B/Yamagata que circularon en el país y en la región durante el período 2010 a 2019 con la cepa vacunal *B/Phuket/3073/2013*. Dentro de los cambios encontrados se destacan los siguientes:

Dentro de las cepas que circularon en el año 2012 y que pertenecen al clado 2 del linaje B/Yamagata se detectaron las mutaciones **T68A**, **R186K**, **I248V** y **S295R** exclusivas para dicho clado. La excepción es la mutación R186K que también fue encontrada en una sola cepa aislada en el país en el año 2018 que pertenecía al clado 3 y en la cepa B/Florida/4/2006 que pertenece al clado 1 de B/Yamagata. Por otro lado, las cepas de Uruguay del año 2012 comparten las mutaciones **D340N**, **E343K** y **K320K** con cepas del clado 3 aisladas en el país en el año 2010 y con varias cepas de la región de ese mismo año y otros. Además, los cambios **E343K** y **K320K** también son compartidos por el clado 1 que está representado por la cepa B/Florida/4/2006.

La mutación **T106I** se encontró no sólo en las cepas del clado 2 aisladas en Uruguay en el año 2012 sino también en cepas del clado 3 del año 2010 y en dos muestras del año 2018 también aisladas en el país. De las cepas seleccionadas de la región sólo presentaron esta mutación cepas del año 2012 aisladas en algunos países de la región. Como se mencionó en el apartado anterior, el cambio T106I también fue encontrado en las cepas B/Victoria que circularon en el país en el año 2017.

A partir del año 2015 en Uruguay y en los países de la región se detectó la mutación **D342N** que en nuestro país circuló también en el 2017 y en la región circuló hasta el 2018 inclusive, sin embargo en 2018 en otros países de la región inclusive en Uruguay tuvo un cambio detectándose **D342K** en la región hasta el 2019 inclusive.

Las cepas de Uruguay del año 2017 y las de la región aisladas en 2017 y 2018 comparten exclusivamente las mutaciones **V60A** y **A67V**. Otra mutación que se empezó a detectar en 2017 en Uruguay y la región y que continuó circulando sin cambios hasta el 2019 inclusive fue la **K373Q**.

Las mutaciones **I49M**, **I171M** y **A395S** se detectaron en Uruguay y en los países de la región en el año 2018 y continuaron circulando sólo en la región hasta el año 2019 inclusive debido a que en el país se detectaron muy pocas cepas de este linaje que no pudieron ser secuenciadas.

19.3.1. Sustituciones en sitio activo, sitios de glicosilación y sitios de resistencia

En todo el período en estudio, en las cepas aisladas en Uruguay no se encontraron sustituciones aminoacídicas en los residuos que forman el sitio activo de la NA ni en los aminoácidos que están en los alrededores (Tabla 3. Anexos 4, 5, 8 y 9). Si bien la mayoría de los sitios catalíticos de la NA no fueron afectados en ambos linajes, se encontró el cambio K371R en una única cepa que circuló en el país en el año 2018 perteneciente al linaje B/Yamagata y el cambio K371Q en las cepas de B/Victoria que circularon en el año 2019 no sólo en Uruguay sino también en la región. Se encontró en las cepas aisladas en el año 2014 pertenecientes al linaje B/Victoria la mutación N198S en los alrededores del sitio catalítico de la NA.

Para ambos linajes de VIB, se encontraron en todas las cepas aisladas los mismos 4 sitios posibles de glicosilación en las posiciones 56, 64, 144 y 284 y no se encontraron otros sitios diferentes. Algunas secuencias de cepas aisladas en el país no pudieron ser secuenciadas en su totalidad y esa es la razón por la cual no cuentan con el sitio 56 (Anexos 12 y 13). En todas las cepas y período estudiado, no se encontraron mutaciones en los posibles sitios de glicosilación.

En las secuencias analizadas de la NA en Uruguay no se detectaron durante el período 2010 a 2019 mutaciones que confieran resistencia a los INA como ser las mutaciones R152K, D197N, D198N, A395E y G402S. Sin embargo, en la posición 198 se detectaron en dos cepas de Uruguay del linaje B/Victoria aisladas en el año 2015 la mutación N198S. Por otro lado, en el país se encontraron en la posición 395 de cepas B/Victoria las mutaciones A395V y A395D aisladas en los años 2010 y 2019 respectivamente y en el linaje B/Yamagata se encontró la mutación A395S en aislados del año 2018 (Tabla 2. Anexos 4 y 5).

En este estudio, se encontraron variaciones relacionadas a la región HA1 únicas para las cepas detectadas en Uruguay, para el linaje B/Victoria se encontraron V87A e I175V y para B/Yamagata la variación D229N. También se encontraron que las variaciones T68A, T106I y V401I en la región parcial de la NA del linaje B/Victoria son únicas también para las cepas uruguayas (Tabla 3).

Linaje B/Yamagata					Linaje B/Victoria				
	Clado	Sub-clado	HA	NA		Clado	Sub-clado	HA	NA
2010	3		K116N ^{*1} , T181K, D202N ^{*1} , E298K ^{*1} , K312E ^{*1}	D340N, E343K y K320E	2010	1	B	L58P	K94R, N199D, N329D
2012	2		R48K, P108A, K116N ^{*1} , I150S, Y165N, T181A ^{*1} , S202N, D229G, E298K ^{*1} , K312E ^{*1}	R186K ^{*2} , T68A, I248V, S295R, T106I ^{*1}	2017	1	A	I117V, V87A ^{*3} , I175V ^{*3}	I120V, K220N, D384G, T68A ^{*3} , T106I ^{*3} , V401I ^{*3}
2017	3		L172Q, M251V	A67V, V60A, D342N	2019	1	A1	I117V, N129G, del162, del163, I180V	I120V, K220N, D384G, K371Q, A395D
2018	3	1°	L172Q, M251V, D229N ^{*3}	I49M, I171M, D342K					
		2°	L172Q, M251V, D232N	I49M, I171M, D342K, A395S					

Tabla 3. Balance de mutaciones en HA y NA para los dos linajes de VIB. Se describen los cambios de aa más relevantes encontrados tanto en la región HA1 de la HA y en la región parcial del gen NA para ambos linajes de VIB durante el período 2010 a 2019. En negrita y con símbolos “*1” y “*2” se indican aquellas mutaciones que son compartidas por los clados 2 y 3 y por los clados 1 y 3 del linaje B/Yamagata respectivamente. En color rojo y con símbolo “*3” se indican las mutaciones únicas encontradas en las cepas uruguayas.

19.4. Distribución de edades según tipo de vigilancia

Durante los años 2012 a 2019 se recibieron en el NIC un total de 5.754 muestras clínicas para la búsqueda de virus respiratorios. Para el año 2019, los casos incluidos en este estudio fueron de

las muestras recibidas hasta el 9 de noviembre de ese año que correspondía a la semana epidemiológica número 45. Los casos reportados de la vigilancia IRAG y ETI durante el período fueron de 5.299 y 455 respectivamente. El grupo etario de pacientes menores a 4 años registró la mayor cantidad de casos tanto para la vigilancia ETI (166/455, 36%) como para la vigilancia IRAG (3.044/5.299, 57%). Las muestras de pacientes con IRAG se distribuyeron principalmente en niños menores a 9 años y adultos mayores a 64 años. En contraste, las muestras de pacientes con ETI tuvieron una distribución más uniforme en todos los grupos de edad, sobresaliendo en niños menores a 4 años y en el grupo etario de 25 a 39 años (Tabla 4). La media de la edad de los pacientes evaluados fue de 4 años y la mediana de los pacientes con ETI (10 años) fue significativamente mayor que la de los pacientes con IRAG ($p < 0,05$).

Característica demográfica	Muestras procesadas	ETI total	IRAG total	Total VIB	B/Vic	B/Yam	B s/id	*p-valor	ETI (+VIB)	IRAG (+VIB)	*p-valor
Media edad en años	20,5	20,5	20,1	22	15,4	29,4			14,3	24,0	
Mediana en años	4	10	4	8	6,5	13,5		<0,05	9,5	9	> 0,05
N° pacientes entre											
0 - 4 años	3210	166	3044	67	39	27	1		9	57	
5 - 9 años	445	52	393	44	30	14	0		13	31	
10 - 14 años	145	30	115	26	16	9	1		8	18	
15- 19 años	55	10	45	3	2	1	0		2	1	
20 - 24 años	90	25	65	5	2	2	1		3	2	
25 - 39 años	284	74	210	18	7	10	1		7	11	
40 - 49 años	210	49	161	11	2	9	0		1	10	
50 - 59 años	304	21	283	6	1	5	0		1	5	
60 - 64 años	177	8	169	3	1	2	0		0	4	
> 64 años	834	20	814	34	10	19	5		0	33	
Total	5754	455	5299	217	110	98	9		44	172	

Tabla 4. Distribución por edad de las infecciones por influenza B según el tipo de vigilancia y según linajes de VIB. Se indican cantidades de pacientes según franja etaria discriminando por tipo de vigilancia y linajes de VIB durante el período 2012 a 2019. Determinación del linaje en muestras $n=208$. *p-valor fue calculado utilizando la prueba de chi-cuadrado de Pearson y la prueba de mediana.

19.5. Prevalencia de los virus influenza B en Uruguay

Del total de muestras recibidas, el 3,8% (217/5.754) correspondieron a positivos para VIB y dentro de éste el 50,7% (110/217) estaba representado por el linaje B/Victoria, el 45,2% (98/217) por el linaje B/Yamagata, mientras que el 4,1% (9/217) restante correspondieron a muestras para las cuales no fue posible subtipificarlas.

Las infecciones por VIB detectadas en todo el período en estudio estaban ampliamente distribuidas entre los diferentes grupos etarios, las 217 muestras que fueron positivas para VIB comprendían a pacientes desde recién nacidos hasta los 88 años. Sin embargo, se observó una clara predominancia en niños y adolescentes con el 60% de las infecciones por VIB. Los pacientes entre los 5 y 14 años representaron sólo el 10,2% de todos los pacientes pero en esa franja etaria se encontró el mayor número de casos para VIB (33%, 69/208) con $p < 0,05$ (Figura 14).

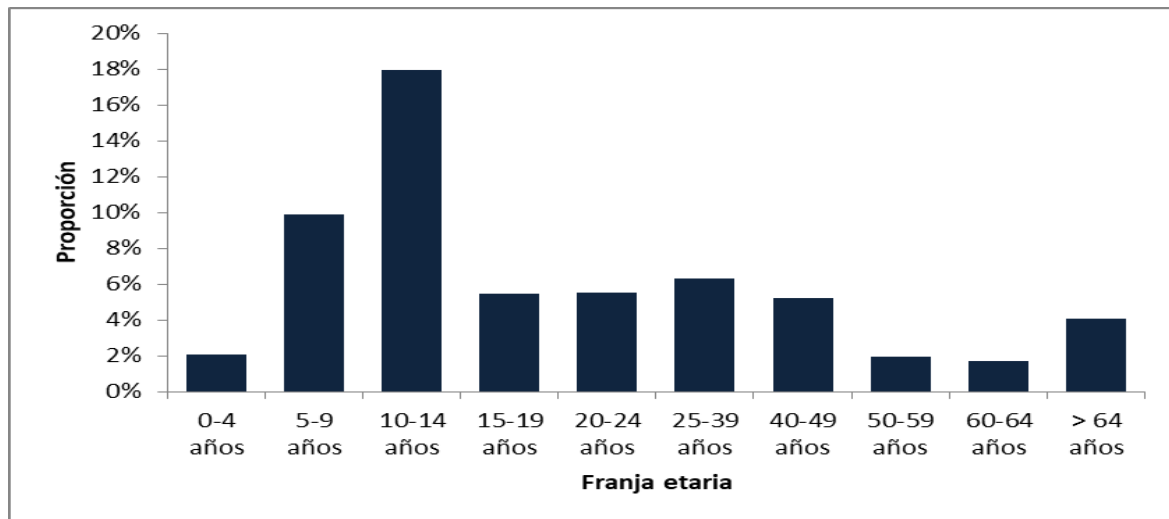


Figura 14. Distribución de casos de VIB realizada por el CNI en la vigilancia durante el 2012 a 2019. Se indican los porcentajes de muestras positivas para VIB para las diferentes franjas etarias.

La media y la mediana de los VIB fueron de 22 y 8 años respectivamente. Para los pacientes con ETI, la tasa más alta fue para el grupo de 5 a 9 años (29.5%, 13/44), seguido por niños menores a 4 años (20.5%, 9/44) y por pacientes en el grupo de 10 a 14 años (18.2%, 8/44). También se observó que a medida que la edad aumentaba, la circulación del virus disminuía y se volvía prácticamente nula en pacientes con edades mayores a 40 años. Por otro lado, en la vigilancia IRAG, se observaron dos picos de circulación principales, siendo la tasa positiva de VIB en pacientes menores a 4 años (33%, 57/172) seguida por pacientes mayores a 64 años (19%, 33/172). En general, aunque la vigilancia ETI se realizó durante 3 de los 8 años estudiados, la proporción de VIB encontrada en los diferentes grupos etarios fue significativamente mayor que la observada entre los casos IRAG (9.7% de ETI, 3.2% de IRAG).

Se observaron algunas diferencias con respecto a la circulación de ambos linajes según la edad. Aunque la proporción de casos menores de 4 años fue similar en ambos linajes (18%, 39/208 para B/Victoria, 13% 27/208 para B/Yamagata), los pacientes de entre 5 y 14 años fueron infectados con mayor frecuencia por el linaje B/Victoria (22% 46/208 para B/Victoria, 11% 23/208 para B/Yamagata). Sin embargo, en edades mayores a 24 años, los virus B/Yamagata circularon en mayor proporción (21% 45/208 para B/Yamagata, 10% 21/208 para B/Victoria) (Tabla 4).

19.6. Interacción entre VIA y VIB

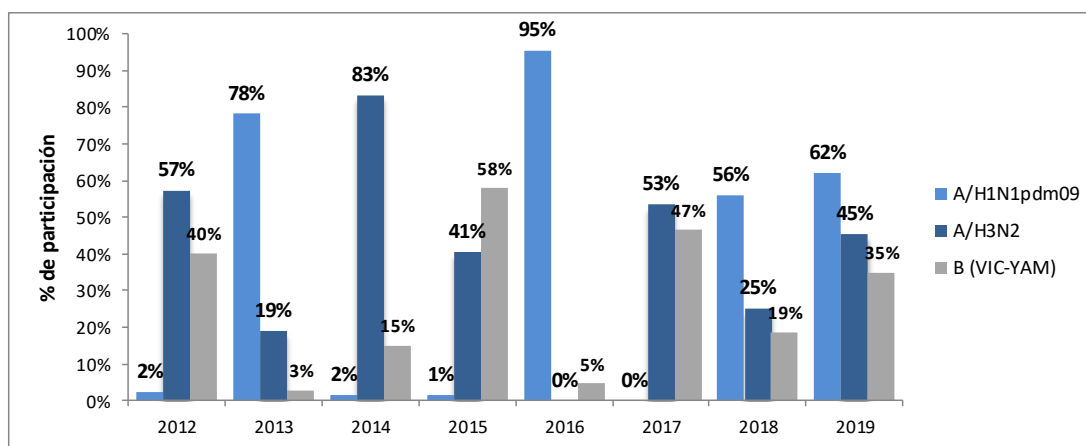
De todas las muestras respiratorias que se procesaron en el CNI durante el período 2012 a 2019 y que fueron positivas para el virus Influenza (14,6%, 843/5.754), se observaron los siguientes porcentajes de participación: 36.9% (311/843) para H1 pdm09 de VIA, 37.4% (315/843) para H3 de VIA y 25.7% (217/843) para VIB.

Por otro lado, se encontraron fluctuaciones en la prevalencia del virus Influenza durante el período estudiado. El VIB raramente domina sobre la circulación de VIA, sin embargo en el año 2015 predominó la circulación de VIB con un 58% y además se detectó una importante circulación de este virus en los años 2012, 2017 y 2019 alcanzando valores del 40%, 47% y 35% de la

circulación total de Influenza respectivamente. La co-circulación de subtipo H3 de VIA y de VIB fue observada en la mayoría de los años del período de estudio (2012, 2014, 2015, 2017, 2018 y 2019). Mientras que la baja incidencia de VIB en los años 2013 y 2016 (3% y 5% respectivamente) parecería corresponderse con la alta circulación detectada para el subtipo H1 de VIA en esos mismos años (78% y 95% respectivamente) (Figura 15).

Del 2012 al 2014 ocurrió un cambio de clado dentro del linaje B/Yamagata. En el año 2012 circularon cepas del clado 2, durante el año 2013 no fue detectado y en el año 2014 circularon cepas del clado 3 de B/Yamagata. Con respecto al linaje B/Victoria únicamente circuló el clado 1A en todo el período estudiado y las cepas que circularon en el 2019 pertenecieron al subclado 1 del clado 1A (Figura 15).

Durante el periodo 2012-2019 se observó en la mayoría de los años la co-circulación en Uruguay de ambos linajes de VIB. La excepción fueron los años 2013 y 2018 en los cuales hubo muy poca circulación o fue detectado un único linaje. Ambos linajes fueron alternando en predominancia, la circulación del linaje B/Yamagata prevaleció en los años 2012 (70%), 2014 (67%) y 2018 (100%) mientras que la circulación del linaje B/Victoria prevaleció en los años 2013 (75%), 2015 (85%), 2016 (75%) y 2019 (71%). En el año 2017 hubo una leve prevalencia del linaje B/Victoria (57% B/Victoria, 43% B/Yamagata) (Figura 16).



H3	H1	H3	B	H1	H3	H1	H1	Influenza predominante
Y2	V1A	Y3	V1A	V1A	V1A	Y3	V1A1	Linaje VIB

Figura 15. Distribución anual de muestras positivas de Influenza procesadas en el CNI durante el período 2012 a 2019. En el gráfico superior se muestran los porcentajes de participación de cada uno de los VIA (H1 y H3) y VIB (linajes B/Victoria y B/Yamagata) determinados por RT-PCR en tiempo real por año durante todo el período de estudio. En la tabla inferior se describe el tipo de Influenza predominante en cada año del período y se indica también el linaje y clado de VIB que circuló. Las abreviaturas V1A, Y3 y Y2 corresponden al clado 1A del linaje B/Victoria, al clado 3 del linaje B/Yamagata y al clado 2 del linaje B/Yamagata respectivamente.

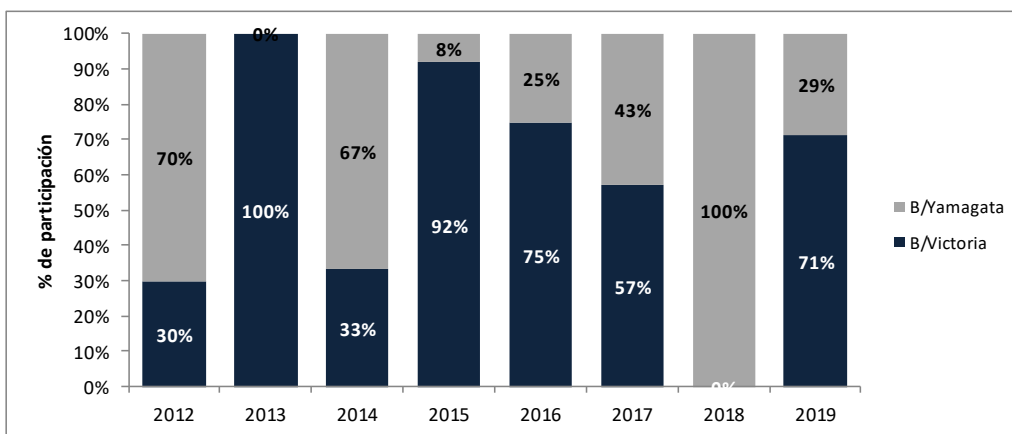
19.7. Concordancia entre cepas circulantes y cepas vacunales

Si bien durante el período en estudio hubo co-circulación de ambos linajes de VIB en la mayoría de los años se observó una alternancia de la predominancia de B/Victoria y B/Yamagata.

Se evaluó el nivel de concordancia de las cepas de VIB que circularon en Uruguay comparándolas con las cepas vacunales recomendadas por la OMS para las vacunas trivalentes de los años 2012-2019 en el hemisferio Sur (Figura 16). Se define como predominante un linaje si está representado por más del 60% de todos los casos de VIB en esa temporada y se define linajes co-dominantes si alguno de los linajes tiene un porcentaje entre el 40 y el 59% de todos los casos de VIB. Por otro lado, se considera que no existe una no coincidencia (del inglés, mismatch) cuando en una temporada el linaje de VIB predominante fue diferente al incluido en la vacuna estacional o cuando en una estación se da la co-dominancia de linajes (Palekar et al. 2019).

La proporción de VIB circulante que no coincidió con la cepa vacunal se calculó en función del número total de muestras tipificadas. Se observó un alto grado de no concordancia en las temporadas de los años 2012, 2013 y 2015 (70%, 100% y 92% respectivamente) entre las cepas que circularon en el país y la incluida en la vacuna trivalente. En el año 2012 la cepa de VIB contenida en la vacuna (*B/Brisbane/60/2008*) pertenecía al linaje B/Victoria, mientras lo que prevaleció en Uruguay fue el linaje B/Yamagata. En el año 2013 la cepa de VIB contenida en la vacuna (*B/Wisconsin/01/2010*) pertenecía al linaje B/Yamagata, mientras que en Uruguay prevaleció el linaje B/Victoria. En el año 2015 la cepa de VIB contenida en la vacuna (*B/Phuket/3073/2013*) pertenecía al clado B/Yamagata, mientras que en Uruguay prevaleció el linaje B/Victoria (Figura 16).

Mientras tanto, en las temporadas 2014, 2016, 2018 y 2019, el linaje de las cepas dominantes coincidió con el linaje de la cepa vacunal seleccionada en la misma temporada. Por ejemplo, en el año 2014 la cepa vacunal (*B/Massachusetts/2/2012*) recomendada por la OMS que pertenece al linaje B/Yamagata clado 2 coincidió con el linaje de las cepas que prevalecieron en el país, sin embargo, las cepas circulantes fueron del clado 3. En 2016 la cepa vacunal recomendada (*B/Brisbane/60/2008*) pertenece al linaje B/Victoria clado 1A y hubo una coincidencia del 75% con lo que circuló en el país. En 2018 hubo un 100% de coincidencia con la cepa vacunal recomendada ya que en el país circuló el mismo linaje de la cepa sugerida e incluida en la vacuna trivalente (*B/Phuket/3073/2013*). En 2019 la coincidencia fue del 71% con la cepa vacunal recomendada (*B/Colorado/06/2017*). Por otro lado, en el año 2017 hubo una coincidencia parcial (B/Victoria 57% y B/Yamagata 43%). Debido a que la cepa sugerida e incluida en las vacunas fue *B/Brisbane/60/2008* pertenece al linaje B/Victoria clado 1A, la misma recomendada el año anterior (Figura 16).



NO V1A	NO Y3	SI Y2	NO Y3	SI V1A	SI V1A	SI Y3	SI V1A1	Cepas Vacunales
								B/Brisbane/60/2008
								B/Colorado/06/2017
								B/Wisconsin/1/2010
								B/Massachus/2/2012
								B/Phuket/3073/2013

Figura 16. Distribución del linaje de Influenza B en Uruguay y recomendación de las cepas vacunales durante el período 2012 a 2019. En el gráfico superior se indican los porcentajes de circulación de ambos linajes para cada temporada en base a las muestras que pudieron ser subtipificadas. En la tabla inferior se indica el linaje de las cepas vacunales recomendadas para cada temporada y se indican con “SI” o “NO” si las vacunales coinciden o no con lo circulado en el país para cada año del período estudiado. Las abreviaturas V1A, Y3, Y2 y V1A1 corresponden al clado 1A del linaje B/Victoria, al clado 3 del linaje B/Yamagata, al clado 2 del linaje B/Yamagata y al subclado 1 del clado A1 del linaje B/Victoria respectivamente.

Discusión

Hasta el presente estudio, se disponía de poca información sobre la epidemiología y las características genéticas de los VIB circulantes en Uruguay (Hortal et al. 1990; Goñi et al. 2007). En promedio, los VIB representaron aproximadamente el 26% de los casos de Influenza positiva durante el período 2012 a 2019. Estos resultados fueron similares a otros países que sugieren que el VIB contribuye significativamente a la enfermedad Influenza (Glezen 2014; Caini et al. 2015, 2017; Barr et al. 2016; Tran et al. 2016; Seleka et al. 2017; Palekar et al. 2019). Nuestros hallazgos revelaron que durante el año 2012 al 2019 los VIA y VIB casi siempre circularon de manera conjunta, confirmando el papel importante del VIB en la propagación de la infección en la población. Se ha sugerido que cuando la actividad de Influenza B es intensa puede producir un impacto similar al de Influenza A (Paul Glezen et al. 2013). Los VIB rara vez dominan en una temporada (Barr et al. 2016), sin embargo, en Uruguay en el año 2015 predominó sobre Influenza A. El aumento de la incidencia de Influenza B también coincidió con un cambio en el linaje predominante de este virus (desde el linaje B/Yamagata en 2014 al linaje B/Victoria en 2015) y con un cambio de clado dentro de un mismo linaje (desde B/Yamagata clado 2 en 2012 a B/Yamagata clado 3 en 2014). En 2013 y 2016, se detectó una menor incidencia de infección causada por el VIB en Uruguay junto con una mayor incidencia del tipo H1 pdm09 de Influenza A. La ausencia del VIB en alguna temporada no es inusual, ya que se sabe que la actividad de este virus es muy variable en todo el mundo, sin un patrón establecido que conduzca a un aumento en el tamaño de la población susceptible y/o a la desaparición de uno o ambos linajes podrían estar relacionados con la variabilidad genética del VIB (McCullers et al. 1999; Baker et al. 2014; Dudas et al. 2015). En algunos años, el VIB representa fuertes “cuellos de botella” en la población y generalmente se asocia con una alta prevalencia del VIA (Chen and Holmes 2008; Yang et al. 2012; Palekar et al. 2019). La interacción con el VIA puede ser central en la configuración de la dinámica evolutiva del VIB y por lo tanto facilitar el cambio en el dominio o codominancia de los linajes entre B/Victoria y B/Yamagata (Chen and Holmes 2008; Langat et al. 2017).

Durante el período de estudio, se observaron diferentes patrones de los linajes B/Victoria y B/Yamagata. Con respecto a la distribución de los diferentes linajes en relación con los grupos etarios de la población estudiada, nuestro estudio demostró que los virus B/Victoria y B/Yamagata tenían más probabilidades de infectar a pacientes de entre 5 y 14 años, siendo esto también observado en estudios anteriores (Glezen 2014; Tewawong et al. 2015; Barr et al. 2016; Horthongkham et al. 2016; Seleka et al. 2017; Trucchi et al. 2017; Tsedenbal et al. 2018). Además, se puede observar que los virus del linaje B/Victoria tienden a distribuirse según la edad con picos predominantes en niños menores de 10 años. Mientras tanto, los virus de linaje B/Yamagata presentan dos picos con mayor frecuencia de casos (en niños menores de 10 años y un predominio significativo en individuos mayores de 25 años, preferentemente adultos mayores de 64 años) como lo observado en otros países (Tan et al. 2013; Sočan et al. 2014; Oong et al. 2015; Vijaykrishna et al. 2015; Langat et al. 2017; Caini et al. 2019). La edad avanzada en los casos con B/Yamagata podría explicar el aumento de la co-morbilidad y esto ha sido observado anteriormente (Moa et al. 2017; Palekar et al. 2019). Curiosamente, se propuso que la diferencia de edad entre las infecciones provocadas por el linaje B/Victoria y el B/Yamagata se debe a diferencias en los aspectos moleculares de la dinámica celular que ayudan a los virus a infectar el epitelio del tracto respiratorio (Vijaykrishna et al. 2015), mientras otros propusieron que un mayor número de virus pertenecientes al linaje B/Victoria podría reducir la edad media de las personas que presentan infecciones específicas de ese linaje (Orsi et al. 2018). Se requieren más estudios para determinar si realmente hay alguna diferencia en cada uno de los linajes de VIB para los distintos grupos etarios.

Con respecto a la distribución de los VIB en relación al tipo de vigilancia, dentro de las personas con IRAG la mayor proporción se da en pacientes menores a 4 años. Esto podría deberse a diferencias en el comportamiento humano debido a que cuando los niños se encuentran enfermos es más probable que sean trasladados al hospital especialmente cuando presentan síntomas de IRAG (Qin et al. 2016). Lo observado en Uruguay también se da en otros países (Tallo et al. 2014; Burmaa et al. 2014). Los hallazgos en los centros centinelas de personas con ETI revelaron que la tasa de positividad de Influenza fue alta entre los niños de 5 a 9 años y se volvió prácticamente nula en pacientes mayores a 40 años. Curiosamente, y aunque la vigilancia de ETI solo se realizó durante 3 de los 8 años que abarcó el estudio, la proporción de VIB encontrada fue significativamente mayor que la observada entre los casos con IRAG en diferentes grupos de edad. Algunos estudios han demostrado que Influenza ha desempeñado un papel importante en las etiologías virales de los casos con ETI (Noh et al. 2013; Fu et al. 2015) mientras que otros virus respiratorios fueron esenciales para la causa de IRAG especialmente en niños (Zhang et al. 2013; Cheng et al. 2017).

El análisis filogenético indicó que las secuencias de HA y NA del VIB determinadas en este estudio se dividieron en dos linajes distintos: B/Victoria y B/Yamagata. El linaje B/Victoria se puede sub-dividir en el sub-clado V1A y V1B. El sub-clado V1B fue detectado en las cepas que circularon en el país en el año 2010 al igual que otros países de la región y del hemisferio norte como en Italia (Tramuto et al. 2016) mientras que el sub-clado V1A fue el único detectado en Uruguay durante 2012-2019. Las secuencias uruguayas y de la región que fueron secuenciadas y que circularon en el año 2010 se relacionaron genéticamente con *B/Montana/05/2012* que es una cepa de referencia para el clado V1B. Por otro lado, ese año la cepa vacunal sugerida por la OMS e incluida en las vacunas trivalentes fue *B/Brisbane/60/2008*, si bien las muestras (9/241, 3.7%) que pudieron ser secuenciadas de ese año pertenecieron al mismo linaje pero a un sub-clado diferente de las cepas circulantes, no podemos concluir que hubo concordancia vacunal debido a que lo secuenciado no es una muestra representativa de ese año. Las secuencias uruguayas obtenidas del año 2012 al 2017 estuvieron genéticamente relacionadas con *B/Brisbane/60/2008* que fue la cepa vacunal recomendada por la OMS para ser utilizada en la formulación trivalente en el hemisferio sur durante los años 2012, 2016 y 2017. En 2019, todos los virus B/Victoria detectados en Uruguay pertenecían al sub-clado V1A1 y se encontró que estaban relacionados genéticamente con *B/Colorado/06/2017*, una cepa vacunal recomendada por la OMS para utilizarse en la vacuna trivalente del año 2019 para todo el hemisferio sur. El sub-clado V1A1 se caracteriza por una delección de dos aminoácidos en las posiciones 162 y 163 de la proteína HA. Los virus con esta doble delección de aminoácidos en la HA fueron detectados en la temporada 2016-2017 en el hemisferio norte y continuaron circulando desde entonces (WHO, 2016). A diferencia de Uruguay, la circulación de estas cepas se ha observado en los países vecinos desde 2017, extendiéndose aún más en 2018 y prevaleciendo en 2019 en la región sudamericana.

El linaje B/Yamagata se puede subdividir en los clados 2 y 3. En Uruguay, el clado 3 de este linaje se detectó desde el año 2014 y hasta el último año del período que fue el año 2019. Las secuencias del clado 3 fueron similares a *B/Phuket/3073/2013* una cepa vacunal recomendada por la OMS e incluida en la vacuna trivalente para el hemisferio sur en los años 2015 y 2018. El clado 2 del linaje B/Yamagata se encontró solo en 2012 en el país, reportes recientes indican que en los últimos años ha bajado sustancialmente la incidencia del virus perteneciente al clado 2 (Langat et al. 2017). El mecanismo por el cual se lleva a la rotación de linajes entre distintos

linajes de VIB no está del todo claro, sin embargo se especula que puede resultar de la selección inmune debido a la acumulación de la inmunidad de rebaño en la población humana (Chen and Holmes 2008). Se sugiere también que el linaje menos dominante de VIB con antigenicidad distinta puede recuperar el dominio cuando el otro linaje predominante ha inducido suficientemente inmunidad de rebaño en los hospedadores, ya sea mediante la recuperación de la infección o la vacunación (Oong et al. 2015). Por otro lado, la co-circulación de los clados 2 y 3 de B/Yamagata fue detectado en las cepas seleccionadas de la región de los países vecinos en los años 2012 a 2014. La co-existencia de ambos clados del linaje Yamagata en una región le permite a estos virus evolucionar en múltiples dimensiones (Langat et al. 2017). La mezcla de virus de temporadas vecinas es menos vista para el linaje B/Victoria que para los virus del linaje B/Yamagata (Kuo et al. 2016).

Los sitios antigénicos de la región HA1 de la HA de VIB se encuentran en el bucle-120 y en sus zonas circundantes, el bucle-150, el bucle-160 y en la hélice-190 (Berton et al. 1984; Rivera et al. 1995; Wang et al. 2008; Shen et al. 2009; Fang et al. 2015) y se ha demostrado que se encuentran bajo presión de selección positiva en el transcurso de la evolución (Wang et al. 2008; Shen et al. 2009). Investigaciones recientes han sugerido la presencia de residuos antigénicos adicionales más allá de estas regiones conocidas (Suptawiwat et al. 2017). No obstante, si bien las sustituciones que ocurren en estas regiones podrían contribuir a la alteración estructural de la glicoproteína HA lo que llevaría a cambios en la antigenicidad (Shen et al. 2009) no todas las mutaciones son epidemiológicamente relevantes. En este estudio y en comparación con la cepa vacunal linaje específico, se encontraron varias sustituciones aminoacídicas en los epítopes antigénicos de los virus uruguayos secuenciados. En los virus B/Victoria, las mutaciones se observaron principalmente en la región del bucle-120. Se encontraron mutaciones en la región del bucle-150 hasta el año 2015 y no ocurrieron mutaciones en la región de la hélice-190. Variaciones en el bucle-160 se encontraron en las secuencias uruguayas a partir del año 2019. Estudios previos demostraron que el bucle-120 es una de las regiones con mayor variabilidad y juega un papel crucial para estabilizar la estructura de la proteína HA (Wang et al. 2008; Tramuto et al. 2016). Las inserciones o deleciones dentro de la región del bucle-160 podrían permitir que el VIB sobreviva más tiempo sin sufrir un cambio antigénico (Nerome et al. 1998). Mientras tanto, en los virus B/Yamagata, se encontraron mutaciones en los cuatro sitios antigénicos solo para las muestras aisladas en el año 2012, el gran número de sustituciones de aminoácidos encontrados en las cepas de ese año podría deberse al hecho de que las secuencias de HA de eran de un clado diferente del clado de la cepa vacunal utilizado ese año. La inexistencia de sustituciones de aminoácidos en los sitios antigénicos en los años posteriores a 2012 estaría confirmando de alguna manera que los virus del linaje B/Yamagata evolucionan de manera más lenta.

En algunos de los años estudiados, se observaron sustituciones de aminoácidos que solo circularon en Uruguay y que se encuentran fuera de las regiones antigénicas conocidas del gen HA. Además, esas mismas muestras presentan sustituciones que también son únicas para el gen HA. Investigaciones recientes han sugerido la presencia de residuos antigénicos adicionales fuera de las cuatro regiones antigénicas conocidas (Suptawiwat et al. 2017). Los cambios de aminoácidos en estas regiones pueden alterar la antigenicidad viral y potencialmente cambiar la dirección de la evolución a medida que evolucionan hacia nuevos linajes (Shen et al. 2009). Estas mutaciones pueden haber contribuido a aumentar la capacidad adaptativa viral. Si estas variaciones contribuyen a la evolución antigénica entonces los cambios en estas posiciones podrían haber causado cambios conformacionales que afectan los sitios antigénicos. Además, es importante que la actividad de las dos principales glicoproteínas estén balanceadas para mantener

eficientemente la capacidad de infección y de liberación de las partículas virales (McAuley et al. 2019), las mutaciones compensatorias son necesarias para mantener la capacidad replicativa del virus (Lin et al. 2010; Mohr et al. 2015). También es imperativo que la actividad relativa de las dos proteínas esté equilibrada para mantener la capacidad de infectar y liberar de las células de manera eficiente. A excepción de las mutaciones únicas encontradas en las cepas que circularon en Uruguay, el resto de las variaciones detectadas durante el período 2010 a 2019 fueron reportadas anteriormente en otros trabajos (Oong et al. 2015; Tewawong et al. 2015; Norway National Influenza Centre, 2017, 2019; Seleka et al. 2017; Langat et al. 2017; Tivane et al. 2018; Francis Crick Institute, 2019; McAuley et al. 2019).

Se han reportado que los sitios 248 y 373 de la NA del linaje B/Yamagata y los sitios 106 y 345 en B/Victoria se encuentran bajo presión selectiva (Wang et al. 2008; Shen et al. 2009). Los sitios 248 y 373 se encontraron en las cepas uruguayas del linaje B/Yamagata aisladas en el año 2012 y en los años 2017 y 2018 respectivamente. Por otro lado, en las muestras del linaje B/Victoria del año 2017 y en los aislados de los años 2014 y 2017 se encontraron mutaciones en los sitios 106 y 345 respectivamente. En las variaciones encontradas en ambas glicoproteínas, se destacan que las combinaciones de mutaciones más relevantes e informativas para cada linaje de VIB que ocurrieron en los años 2010, 2012, 2017 y 2018 para el linaje B/Yamagata y en los años 2010, 2017 y 2019 para el linaje B/Victoria. Por otro lado, se destaca también que cepas del linaje B/Victoria detectadas en el Hemisferio Norte en el año 2019 presentaron con una triple delección (Δ 162-164) en sus HA como también las mutaciones K371Q y A395T en sus NA (Francis Crick Institute, 2019). En Uruguay y en la región, las cepas aisladas del linaje B/Victoria durante ese mismo año contenían una doble delección (Δ 162-163) en sus HA y las mutaciones K371Q y A395D en sus NA. Si bien se encontraron mutaciones en sitios han sido reportado como resistentes a los INA, son necesarios más estudios que confirmen el fenotipo de resistencia de tales mutaciones.

Es de destacar que el 45% de las secuencias uruguayas de linaje B/Yamagata analizadas en el año 2018 presentaron un nuevo sitio potencial de glicosilación en la posición 232, que también se observó en países vecinos y en otras regiones del mundo (Norway National Influenza Centre, 2017; Tivane et al. 2018). La N-glicosilación juega un papel importante en la estabilización de la estructura de la HA protegiéndola de ser hidrolizada y evitando el reconocimiento de anticuerpos (Wang et al. 2008). Además, el virus VIB también utiliza la adición o la eliminación de glicosilación en la HA como un mecanismo para la deriva antigénica facilitando la adaptación viral (Shen et al. 2009). Se sabe que la diversidad en la glicosilación en el epítipo de la región HA1 de la HA produce cambio antigénico (Wang et al. 2008).

Hasta ahora, la vacunación sigue siendo la medida preventiva más efectiva para reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad (Soema et al. 2015; Mosterín Höpping et al. 2016). La selección de la cepa del VIB para la vacuna trivalente anual es un desafío ya que debido al bajo efecto protector de la vacunación es cuando el linaje opuesto a la vacuna o ambos linajes comienzan a circular en la población (Beran et al. 2009; Belshe et al. 2010; Hu et al. 2015; Sharabi et al. 2016; Demicheli et al. 2018). Estudios recientes en Australia, Estados Unidos, Europa, América Latina y el Caribe muestran que hay más de un tercio de no concordancia entre la vacuna y el linaje circulante predominante (Qin et al. 2016; Caini et al. 2017; Moa et al. 2017; Palekar et al. 2019). De hecho, se demostró aquí en Uruguay y en la región que ambos linajes de VIB circularon en diferentes proporciones en casi todo el período 2012-2019. Nuestros hallazgos evidenciaron que la no concordancia entre las cepas circulantes y las vacunales varió durante las 8 temporadas estudiadas observándose un mayor impacto en el año 2015, también se demostró

que el 28% de las infecciones con Influenza B que circulaban en Uruguay no correspondían al linaje de la cepa vacunal. El impacto potencial del desajuste vacunal ha sido ampliamente investigado y los hallazgos resaltaron el efecto que tiene sobre la epidemiología de los virus Influenza. Además, se ha reportado que la eficacia de la vacuna contra la gripe B se reduce bastante cuando el linaje circulante no coincide con el linaje de la vacuna (Beran et al. 2009). Si bien en Uruguay fue administrada la vacuna trivalente de forma gratuita, especialmente aquellos con alto riesgo, la cobertura vacunal se mantuvo baja (en promedio 24% y 30% en pacientes menores a 4 años y mayores a 64 años, respectivamente) como ha sido reportado también en otros países de la región (Tinoco et al. 2017; Palekar et al. 2019). La falta de disponibilidad de datos de vacunación y de análisis antigénicos en nuestra población de estudio limita nuestra posibilidad de hacer alguna inferencia sobre este tema. Sin embargo, la magnitud del impacto de la no coincidencia vacunal en la epidemiología de los virus Influenza depende de varios factores durante una determinada estación y de la proporción de cada linaje de VIB que circula (Reed et al. 2015). Se puede esperar que las vacunas cuadrivalentes desarrolladas que contienen cepas de ambos linajes, aumenten la efectividad de la vacuna y reduzcan la morbilidad y mortalidad causadas por el virus. Parece una consecuencia lógica que los niños podrían beneficiarse más en la implementación de medidas preventivas específicas basadas en vacunas, con el potencial de reducir la carga de la enfermedad en individuos vacunados y no vacunados. Sin embargo, hasta ahora solo unos pocos países recomiendan la vacunación con formulaciones cuatrivalentes contra Influenza distribuyéndola de forma gratuita (ECDC, 2020).

Aunque la información de otros segmentos genéticos internos puede representar una limitación importante de este estudio, los resultados presentados proporcionan evidencia de la heterogeneidad e información genética para estimar la variabilidad de los VIB circulantes en Uruguay y en los países de la región. Es necesario realizar análisis antigénico adicionales para evaluar las características de las cepas vacunales candidatas y las cepas circulantes, especialmente en aquellas que poseen variaciones en los sitios antigénicos y en los sitios de glicosilación de la glicoproteína HA. La comparación de la relación antigénica con las sustituciones de aminoácidos ayuda a definir cepas vacunales apropiadas. Otra limitación es que solo se examinaron mutaciones en la glicoproteína NA en sitios antigénicos que han sido descritos anteriormente, por lo que son necesarias pruebas de susceptibilidad de aislamientos de pacientes y estudios de vigilancia antiviral, así como también la caracterización funcional de marcadores moleculares de resistencia a fármacos. A pesar de las limitaciones, el sistema de vigilancia de los VIB ha demostrado ser útil para describir el comportamiento epidemiológico y evolutivo de estos virus que han estado circulando en Uruguay durante los últimos años y los resultados demuestran que el VIB va evolucionando de acuerdo con otras observaciones reportadas en otras regiones (Glezen 2014).

Conclusiones

Este estudio es uno de los primeros en destacar la prevalencia y las características moleculares de los genes parciales de las glicoproteínas HA y NA de las cepas del VIB que han circulado en Uruguay en los últimos años. Nuestros hallazgos, como otros estudios, confirman la variabilidad genética de los VIB y muestran la importancia de la vigilancia epidemiológica y molecular para el manejo efectivo de las epidemias de Influenza. Comprender el comportamiento evolutivo diferente que tienen los virus Influenza y cómo puede interactuar entre ellos, es claramente importante para predecir su impacto en las poblaciones humanas y para mejorar los sistemas de vigilancia llevando a una mejor predicción y sugerencia para el desarrollo de las vacunas.

Referencias

- Abe Y, Takashita E, Sugawara K, et al (2004) Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol* 78:9605–9611. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.9605-9611.2004>
- Abed Y, Coulthart MB, Li Y, Boivin G (2003) Evolution of surface and nonstructural-1 genes of influenza B viruses isolated in the Province of Québec, Canada, during the 1998-2001 period. *Virus Genes* 27:125–135
- Aebi T, Weisser M, Bucher E, et al (2010) Co-infection of Influenza B and Streptococci causing severe pneumonia and septic shock in healthy women. *BMC Infect Dis* 10:308. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-308>
- Ambrose CS, Levin MJ (2012) The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 8:81–88. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.17623>
- Ambrose CS, Yi T, Walker RE, Connor EM (2008) Duration of protection provided by live attenuated influenza vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 27:744–748. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318174e0f8>
- An Y, Parsons LM, Jankowska E, et al (2019) N-Glycosylation of Seasonal Influenza Vaccine Hemagglutinins: Implication for Potency Testing and Immune Processing. *J Virol* 93:. <https://doi.org/10.1128/JVI.01693-18>
- Arvia R, Corcioli F, Pierucci F, Azzi A (2014) Molecular markers of influenza B lineages and clades. *Viruses* 6:4437–4446. <https://doi.org/10.3390/v6114437>
- Bahl J, Nelson MI, Chan KH, et al (2011) Temporally structured metapopulation dynamics and persistence of influenza A H3N2 virus in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:19359–19364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109314108>
- Baigent SJ, McCauley JW (2003) Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays* 25:657–671. <https://doi.org/10.1002/bies.10303>
- Baker SF, Nogales A, Finch C, et al (2014) Influenza A and B virus intertypic reassortment through compatible viral packaging signals. *J Virol* 88:10778–10791. <https://doi.org/10.1128/JVI.01440-14>
- Bancroft CT, Parslow TG (2002) Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. *J Virol* 76:7133–7139. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.14.7133-7139.2002>
- Baranovich T, Webster RG, Govorkova EA (2011) Fitness of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses. *Curr Opin Virol* 1:574–581. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.08.006>
- Barr IG, Vijaykrishna D, Sullivan SG (2016) Differential age susceptibility to influenza B/Victoria lineage viruses in the 2015 Australian influenza season. *Euro Surveill* 21:. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.4.30118>
- Basak S, Tomana M, Compans RW (1985) Sialic acid is incorporated into influenza hemagglutinin glycoproteins in the absence of viral neuraminidase. *Virus Res* 2:61–68. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(85\)90060-7](https://doi.org/10.1016/0168-1702(85)90060-7)

- Bastien N, Gubbay JB, Richardson D, et al (2011) Detection of an influenza B virus strain with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J Clin Microbiol* 49:4020–4021. <https://doi.org/10.1128/JCM.05069-11>
- Baxter R, Patriarca PA, Ensor K, et al (2011) Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok® trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. *Vaccine* 29:2272–2278. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.039>
- Bedford T, Cobey S, Beerli P, Pascual M (2010) Global migration dynamics underlie evolution and persistence of human influenza A (H3N2). *PLoS Pathog* 6:e1000918. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000918>
- Bedford T, Cobey S, Pascual M (2011) Strength and tempo of selection revealed in viral gene genealogies. *BMC Evol Biol* 11:220. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-220>
- Bedford T, Riley S, Barr IG, et al (2015) Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature* 523:217–220. <https://doi.org/10.1038/nature14460>
- Bedford T, Suchard MA, Lemey P, et al (2014) Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *Elife* 3:e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914>
- Belshe RB (2010) The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine* 28 Suppl 4:D45-53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.028>
- Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, et al (2010) Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. *Vaccine* 28:2149–2156. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.068>
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al (2018) GenBank. *Nucleic Acids Res* 46:D41–D47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1094>
- Beran J, Wertzova V, Honegr K, et al (2009) Challenge of conducting a placebo-controlled randomized efficacy study for influenza vaccine in a season with low attack rate and a mismatched vaccine B strain: a concrete example. *BMC Infect Dis* 9:2. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-2>
- Berlanda Scorza F, Tsvetnitsky V, Donnelly JJ (2016) Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines. *Vaccine* 34:2926–2933. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.085>
- Berton MT, Naeve CW, Webster RG (1984) Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies. *J Virol* 52:919–927
- Berton MT, Webster RG (1985) The antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: operational and topological mapping with monoclonal antibodies. *Virology* 143:583–594. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90396-4)
- Blanc A, Ruchansky D, Clara M, et al (2009) Serologic evidence of influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *J Wildl Dis* 45:519–521. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.519>

- Bodewes R, de Mutsert G, van der Klis FRM, et al (2011) Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses in children in Netherlands. *Clin Vaccine Immunol* 18:469–476. <https://doi.org/10.1128/CVI.00396-10>
- Bodewes R, Morick D, de Mutsert G, et al (2013) Recurring influenza B virus infections in seals. *Emerging Infect Dis* 19:511–512. <https://doi.org/10.3201/eid1903.120965>
- Bolte H, Rosu ME, Hagelauer E, et al (2019) Packaging of the Influenza Virus Genome Is Governed by a Plastic Network of RNA- and Nucleoprotein-Mediated Interactions. *J Virol* 93:. <https://doi.org/10.1128/JVI.01861-18>
- Bouvier NM, Palese P (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4:D49-53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
- Briedis DJ, Lamb RA (1982) Influenza B virus genome: sequences and structural organization of RNA segment 8 and the mRNAs coding for the NS1 and NS2 proteins. *J Virol* 42:186–193
- Briedis DJ, Lamb RA, Choppin PW (1982) Sequence of RNA segment 7 of the influenza B virus genome: partial amino acid homology between the membrane proteins (M1) of influenza A and B viruses and conservation of a second open reading frame. *Virology* 116:581–588. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90150-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90150-7)
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371:37–43. <https://doi.org/10.1038/371037a0>
- Burmaa A, Kamigaki T, Darmaa B, et al (2014) Epidemiology and impact of influenza in Mongolia, 2007-2012. *Influenza Other Respir Viruses* 8:530–537. <https://doi.org/10.1111/irv.12268>
- Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S (1992a) The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J* 11:49–56
- Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S (1992b) The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J* 11:49–56
- Burnham AJ, Baranovich T, Govorkova EA (2013) Neuraminidase inhibitors for influenza B virus infection: efficacy and resistance. *Antiviral Res* 100:520–534. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.023>
- Byarugaba DK, Erima B, Millard M, et al (2013) Genetic analysis of influenza B viruses isolated in Uganda during the 2009-2010 seasons. *Virol J* 10:11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-11>
- Caini S, Alonso WJ, Balmaseda A, et al (2017) Characteristics of seasonal influenza A and B in Latin America: Influenza surveillance data from ten countries. *PLoS ONE* 12:e0174592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174592>
- Caini S, Huang QS, Ciblak MA, et al (2015) Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. *Influenza Other Respir Viruses* 9 Suppl 1:3–12. <https://doi.org/10.1111/irv.12319>
- Caini S, Kuszniierz G, Garate VV, et al (2019) The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century. *PLoS ONE* 14:e0222381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381>

- Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, et al (2006) Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect* 134:1129–1140. <https://doi.org/10.1017/S0950268806007175>
- Cardoso Y, Oliveira E, Vasconcelos J, et al (2012) Characteristics of patients with influenza-like illness, severe acute respiratory illness, and laboratory-confirmed influenza at a major children's hospital in Angola, 2009-2011. *J Infect Dis* 206 Suppl 1:S136-139. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis534>
- Carr S, Ilyushina NA, Franks J, et al (2011) Oseltamivir-resistant influenza A and B viruses pre- and postantiviral therapy in children and young adults with cancer. *Pediatr Infect Dis J* 30:284–288. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181ff863b>
- Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W (1982) The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31:417–427. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90135-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90135-0)
- CDC (2019) How Influenza (Flu) Vaccines Are Made. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/how-fluvaccine-made.htm>. Accessed 28 Dec 2019
- Chaimayo C, Hayashi T, Underwood A, et al (2017) Selective incorporation of vRNP into influenza A virions determined by its specific interaction with M1 protein. *Virology* 505:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.008>
- Chan AY, Vreede FT, Smith M, et al (2006) Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* 351:210–217. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.005>
- Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA (2007a) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* 81:7111–7123. <https://doi.org/10.1128/JVI.00361-07>
- Chen G-W, Shih S-R, Hsiao M-R, et al (2007b) Multiple genotypes of influenza B viruses cocirculated in Taiwan in 2004 and 2005. *J Clin Microbiol* 45:1515–1522. <https://doi.org/10.1128/JCM.02189-06>
- Chen H, Zhou X, Zheng J, Kwok C-K (2016) Rules of co-occurring mutations characterize the antigenic evolution of human influenza A/H3N2, A/H1N1 and B viruses. *BMC Med Genomics* 9:69. <https://doi.org/10.1186/s12920-016-0230-5>
- Chen J, Skehel JJ, Wiley DC (1999) N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8967–8972. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8967>
- Chen R, Holmes EC (2008) The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J Mol Evol* 66:655–663. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>
- Chen S-H, Huang I-A, Wu C-T, et al (2011) Complicated features in a young child with influenza B virus pneumonia and co-infection with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Ann Trop Paediatr* 31:159–162. <https://doi.org/10.1179/1465328111Y.0000000012>
- Cheng W, Yu Z, Liu S, et al (2017) Comparison of Influenza Epidemiological and Virological Characteristics between Outpatients and Inpatients in Zhejiang Province, China, March 2011-June 2015. *Int J Environ Res Public Health* 14:. <https://doi.org/10.3390/ijerph14020217>
- Cherry JL, Lipman DJ, Nikolskaya A, Wolf YI (2009) Evolutionary dynamics of N-glycosylation sites of influenza virus hemagglutinin. *PLoS Curr* 1:RRN1001. <https://doi.org/10.1371/currents.rrn1001>

- Chiu SS, Lau YL, Chan KH, et al (2002) Influenza-related hospitalizations among children in Hong Kong. *N Engl J Med* 347:2097–2103. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020546>
- Cohen M, Zhang X-Q, Senaati HP, et al (2013) Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology* 522:317–321. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.011>
- Colman PM (1994) Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci* 3:1687–1696. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031007>
- Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC (1993) Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* 67:2972–2980
- Colman PM, Varghese JN, Laver WG (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303:41–44. <https://doi.org/10.1038/303041a0>
- Cooper NJ, Sutton AJ, Abrams KR, et al (2003) Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 326:1235. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7401.1235>
- Copeland CS, Doms RW, Bolzau EM, et al (1986) Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J Cell Biol* 103:1179–1191. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1179>
- Correia V, Abecasis AB, Rebelo-de-Andrade H (2018) Molecular footprints of selective pressure in the neuraminidase gene of currently circulating human influenza subtypes and lineages. *Virology* 522:122–130. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.002>
- Cros JF, Palese P (2003) Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* 95:3–12. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(03\)00159-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(03)00159-x)
- Das SR, Hensley SE, David A, et al (2011) Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E1417–1422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108754108>
- Das SR, Hensley SE, Ince WL, et al (2013) Defining influenza A virus hemagglutinin antigenic drift by sequential monoclonal antibody selection. *Cell Host Microbe* 13:314–323. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.008>
- de Jong JC, Beyer WE, Palache AM, et al (2000) Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol* 61:94–99
- de Vries RP, de Vries E, Bosch BJ, et al (2010) The influenza A virus hemagglutinin glycosylation state affects receptor-binding specificity. *Virology* 403:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.047>
- Demicheli V, Jefferson T, Ferroni E, et al (2018) Vaccines for preventing influenza in healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD001269. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001269.pub6>
- Deom CM, Schulze IT (1985) Oligosaccharide composition of an influenza virus hemagglutinin with host-determined binding properties. *J Biol Chem* 260:14771–14774
- Dou D, Revol R, Östbye H, et al (2018) Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol* 9:1581. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>

- Dowell SF (2001) Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerging Infect Dis* 7:369–374. <https://doi.org/10.3201/eid0703.010301>
- Doyle TM, Li C, Bucher DJ, et al (2013) A monoclonal antibody targeting a highly conserved epitope in influenza B neuraminidase provides protection against drug resistant strains. *Biochem Biophys Res Commun* 441:226–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.041>
- Drake JW (1993) Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4171–4175. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4171>
- Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, et al (2012) Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 337:1343–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1222908>
- Dudas G, Bedford T, Lycett S, Rambaut A (2015) Reassortment between influenza B lineages and the emergence of a coadapted PB1-PB2-HA gene complex. *Mol Biol Evol* 32:162–172. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu287>
- ECDC, (2020) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Immunization schedules by target disease. Accessed 25th January 2020. <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/>
- Enami M, Sharma G, Benham C, Palese P (1991) An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185:291–298. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90776-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90776-8)
- Escuret V, Collins PJ, Casalegno J-S, et al (2014) A novel I221L substitution in neuraminidase confers high-level resistance to oseltamivir in influenza B viruses. *J Infect Dis* 210:1260–1269. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu244>
- Escuret V, Frobert E, Bouscambert-Duchamp M, et al (2008) Detection of human influenza A (H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol* 41:25–28. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.019>
- Fang Q, Gao Y, Chen M, et al (2015) Molecular epidemiology and evolution of influenza A and B viruses during winter 2013–2014 in Beijing, China. *Arch Virol* 160:1083–1095. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2362-x>
- FDA (2013a) Fluarix Quadrivalent. GlaxoSmithKline Biologicals. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/fluarix-quadrivalent>. Accessed 18th January 2020. FDA
- FDA (2013b) FluMist Quadrivalent. MedImmune, LLC. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/flumist-quadrivalent>. Accessed 18th January 2020. FDA
- FDA (2013c) Fluzone Quadrivalent. Sanofi Pasteur Inc. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/fluzone-high-dose-quadrivalent>. Accessed 18th January 2020. FDA
- Felsenstein J (1985) CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution* 39:783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fourment M, Wood JT, Gibbs AJ, Gibbs MJ (2010) Evolutionary dynamics of the N1 neuraminidases of the main lineages of influenza A viruses. *Mol Phylogenet Evol* 56:526–535. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.039>
- Francis Crick Institute, (2019) Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccines for the Southern Hemisphere 2020. 23rd – 26th September 2019. WORLDWIDE

INFLUENZA CENTRE WHO CC for Reference & Research on Influenza The Francis Crick Institute. London, United Kingdom. Accessed 25th January 2020.
<https://www.crick.ac.uk/partnerships/worldwide-influenza-centre/annual-and-interim-reports>

Francis T (1940) A NEW TYPE OF VIRUS FROM EPIDEMIC INFLUENZA. *Science* 92:405–408.
<https://doi.org/10.1126/science.92.2392.405>

Frank H, Wittekind C, Liebert UG, et al (2010) Lethal influenza B myocarditis in a child and review of the literature for pediatric age groups. *Infection* 38:231–235. <https://doi.org/10.1007/s15010-010-0013-4>

Fu Y, Pan L, Sun Q, et al (2015) The clinical and etiological characteristics of influenza-like illness (ILI) in outpatients in Shanghai, China, 2011 to 2013. *PLoS ONE* 10:e0119513.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119513>

Fujii Y, Goto H, Watanabe T, et al (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2002–2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437772100>

Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, et al (2012) A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 429:51–56.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.095>

Gambaryan AS, Robertson JS, Matrosovich MN (1999) Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology* 258:232–239.
<https://doi.org/10.1006/viro.1999.9732>

Garg S, Moore Z, Lee N, et al (2013) A cluster of patients infected with I221V influenza B virus variants with reduced oseltamivir susceptibility--North Carolina and South Carolina, 2010-2011. *J Infect Dis* 207:966–973. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis776>

Gerber M, Isel C, Moules V, Marquet R (2014) Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol* 22:446–455.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.001>

Gerdil C (2003) The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21:1776–1779.
[https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00071-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00071-9)

Glezen WP (2008) Clinical practice. Prevention and treatment of seasonal influenza. *N Engl J Med* 359:2579–2585. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0807498>

Glezen WP (2014) Editorial commentary: Changing epidemiology of influenza B virus. *Clin Infect Dis* 59:1525–1526. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu668>

Goldstein E, Cobey S, Takahashi S, et al (2011) Predicting the epidemic sizes of influenza A/H1N1, A/H3N2, and B: a statistical method. *PLoS Med* 8:e1001051. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001051>

Gong J, Xu W, Zhang J (2007) Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem* 14:113–122. <https://doi.org/10.2174/092986707779313444>

Goñi N, Baz M, Ruchansky D, et al (2007) Influenza B viruses isolated in Uruguay during the 2002-2005 seasons: genetic relations and vaccine strain match. *Virus Res* 123:100–104.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.08.002>

- Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, et al (2004) Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 303:327–332. <https://doi.org/10.1126/science.1090727>
- Gubareva LV (2004) Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 103:199–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.02.034>
- Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al (2005) Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280:5571–5580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410592200>
- Gulyaev AP, Fouchier RAM, Olsthoorn RCL (2010) Influenza virus RNA structure: unique and common features. *Int Rev Immunol* 29:533–556. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.507828>
- Gutiérrez-Pizarra A, Pérez-Romero P, Alvarez R, et al (2012) Unexpected severity of cases of influenza B infection in patients that required hospitalization during the first postpandemic wave. *J Infect* 65:423–430. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.07.004>
- Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D (2008) The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89:2359–2376. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004606-0>
- Han T, Marasco WA (2011) Structural basis of influenza virus neutralization. *Ann N Y Acad Sci* 1217:178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05829.x>
- Harper SA, Bradley JS, Englund JA, et al (2009) Seasonal influenza in adults and children--diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1003–1032. <https://doi.org/10.1086/598513>
- Harris A, Cardone G, Winkler DC, et al (2006) Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19123–19127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>
- Hatakeyama S, Ozawa M, Kawaoka Y (2011) In vitro selection of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *Clin Microbiol Infect* 17:1332–1335. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03313.x>
- Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, et al (2007) Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *JAMA* 297:1435–1442. <https://doi.org/10.1001/jama.297.13.1435>
- Hatta M, Goto H, Kawaoka Y (2004) Influenza B virus requires BM2 protein for replication. *J Virol* 78:5576–5583. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5576-5583.2004>
- Hatta M, Kawaoka Y (2003) The NB protein of influenza B virus is not necessary for virus replication in vitro. *J Virol* 77:6050–6054. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.10.6050-6054.2003>
- Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP (2001) The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 356:1861–1870. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0999>
- Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, et al (1999a) Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med* 341:1336–1343. <https://doi.org/10.1056/NEJM199910283411802>

- Hayden FG, Osterhaus AD, Treanor JJ, et al (1997) Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. GG167 Influenza Study Group. *N Engl J Med* 337:874–880. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709253371302>
- Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, et al (1999b) Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA* 282:1240–1246. <https://doi.org/10.1001/jama.282.13.1240>
- Hayward AC, Fragaszy EB, Bermingham A, et al (2014) Comparative community burden and severity of seasonal and pandemic influenza: results of the Flu Watch cohort study. *Lancet Respir Med* 2:445–454. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70034-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70034-7)
- He G, Massarella J, Ward P (1999) Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clin Pharmacokinet* 37:471–484. <https://doi.org/10.2165/00003088-199937060-00003>
- Hensley SE, Das SR, Bailey AL, et al (2009) Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift. *Science* 326:734–736. <https://doi.org/10.1126/science.1178258>
- Hervé P-L, Lorin V, Jouvion G, et al (2015) Addition of N-glycosylation sites on the globular head of the H5 hemagglutinin induces the escape of highly pathogenic avian influenza A H5N1 viruses from vaccine-induced immunity. *Virology* 486:134–145. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.033>
- Higgins RR, Beniprashad M, Chong-King E, et al (2012) Recovery of influenza B virus with the H273Y point mutation in the neuraminidase active site from a human patient. *J Clin Microbiol* 50:2500–2502. <https://doi.org/10.1128/JCM.00682-12>
- Hoffmann E, Mahmood K, Yang C-F, et al (2002) Rescue of influenza B virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11411–11416. <https://doi.org/10.1073/pnas.172393399>
- Hortal M, Russi JC, Arbiza JR, et al (1990) Identification of viruses in a study of acute respiratory tract infection in children from Uruguay. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 8:S995-997. https://doi.org/10.1093/clinids/12.supplement_8.s995
- Horthongkham N, Athipanyasilp N, Pattama A, et al (2016) Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014. *PLoS ONE* 11:e0158244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158244>
- Horvath CM, Williams MA, Lamb RA (1990) Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J* 9:2639–2647
- Hovanec DL, Air GM (1984) Antigenic structure of the hemagglutinin of influenza virus B/Hong Kong/8/73 as determined from gene sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies. *Virology* 139:384–392. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90384-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90384-2)
- Hu Y-J, Chow K-C, Liu C-C, et al (2015) Using combinatorial bioinformatics methods to analyze annual perspective changes of influenza viruses and to accelerate development of effective vaccines. *J Formos Med Assoc* 114:774–778. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.03.018>
- Huang TS, Palese P, Krystal M (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* 64:5669–5673

- Hurt AC, Barr IG, Hartel G, Hampson AW (2004) Susceptibility of human influenza viruses from Australasia and South East Asia to the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir. *Antiviral Res* 62:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.11.008>
- Hurt AC, Iannello P, Jachno K, et al (2006) Neuraminidase inhibitor-resistant and -sensitive influenza B viruses isolated from an untreated human patient. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1872–1874. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1872-1874.2006>
- Hutchinson EC, Charles PD, Hester SS, et al (2014) Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat Commun* 5:4816. <https://doi.org/10.1038/ncomms5816>
- Hutchinson EC, Fodor E (2012) Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine* 30:7353–7358. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.085>
- Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, Digard P (2010) Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* 91:313–328. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017608-0>
- Illingworth CJR, Mustonen V (2012) Components of selection in the evolution of the influenza virus: linkage effects beat inherent selection. *PLoS Pathog* 8:e1003091. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003091>
- Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL, et al (2006) Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *J Infect Dis* 193:760–764. <https://doi.org/10.1086/500465>
- Jackson D, Barclay W, Zürcher T (2005) Characterization of recombinant influenza B viruses with key neuraminidase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother* 55:162–169. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh528>
- Jin H, Chen Z, Liu J, Kemble G (2012) Genetic engineering of live attenuated influenza viruses. *Methods Mol Biol* 865:163–174. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-621-0_10
- Joosting AC, Head B, Bynoe ML, Tyrrell DA (1968) Production of common colds in human volunteers by influenza C virus. *Br Med J* 4:153–154. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5624.153>
- Kamali A, Holodniy M (2013) Influenza treatment and prophylaxis with neuraminidase inhibitors: a review. *Infect Drug Resist* 6:187–198. <https://doi.org/10.2147/IDR.S36601>
- Kanegae Y, Sugita S, Endo A, et al (1990) Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J Virol* 64:2860–2865
- Kaverin NV, Klenk HD (1999) Strain-specific differences in the effect of influenza A virus neuraminidase on vector-expressed hemagglutinin. *Arch Virol* 144:781–786. <https://doi.org/10.1007/s007050050543>
- Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, et al (2006) A comparison of the effectiveness of oseltamivir for the treatment of influenza A and influenza B: a Japanese multicenter study of the 2003–2004 and 2004–2005 influenza seasons. *Clin Infect Dis* 43:439–444. <https://doi.org/10.1086/505868>
- Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, et al (2008) A comparison of the effectiveness of zanamivir and oseltamivir for the treatment of influenza A and B. *J Infect* 56:51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.09.002>

- Kim JI, Lee I, Park S, et al (2016) Reassortment compatibility between PB1, PB2, and HA genes of the two influenza B virus lineages in mammalian cells. *Sci Rep* 6:27480. <https://doi.org/10.1038/srep27480>
- Kim MH, Kang J-O, Kim J-Y, et al (2019) Single mucosal vaccination targeting nucleoprotein provides broad protection against two lineages of influenza B virus. *Antiviral Res* 163:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.002>
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- King JC, Cox MM, Reisinger K, et al (2009) Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy children aged 6-59 months. *Vaccine* 27:6589–6594. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.032>
- Kirkpatrick E, Qiu X, Wilson PC, et al (2018) The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. *Sci Rep* 8:10432. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28706-1>
- Knossow M, Skehel JJ (2006) Variation and infectivity neutralization in influenza. *Immunology* 119:1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02421.x>
- Kobasa D, Kodihalli S, Luo M, et al (1999) Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J Virol* 73:6743–6751
- Koelle K, Cobey S, Grenfell B, Pascual M (2006) Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. *Science* 314:1898–1903. <https://doi.org/10.1126/science.1132745>
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631–664. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.003215>
- Korte T, Ludwig K, Huang Q, et al (2007) Conformational change of influenza virus hemagglutinin is sensitive to ionic concentration. *Eur Biophys J* 36:327–335. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0116-0>
- Kosik I, Ince WL, Gentles LE, et al (2018) Influenza A virus hemagglutinin glycosylation compensates for antibody escape fitness costs. *PLoS Pathog* 14:e1006796. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006796>
- Koutsakos M, Nguyen THO, Barclay WS, Kedzierska K (2016) Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiol* 11:119–135. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>
- Krammer F, Fouchier RAM, Eichelberger MC, et al (2018) NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines? *MBio* 9:. <https://doi.org/10.1128/mBio.02332-17>
- Krammer F, Palese P (2013) Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Curr Opin Virol* 3:521–530. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.07.007>
- Krammer F, Palese P (2015) Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat Rev Drug Discov* 14:167–182. <https://doi.org/10.1038/nrd4529>

- Krell S, Adams I, Arnold U, et al (2003) Influenza B pneumonia with *Staphylococcus aureus* superinfection associated with parvovirus B19 and concomitant agranulocytosis. *Infection* 31:353–358. <https://doi.org/10.1007/s15010-003-3091-8>
- Kuo S-M, Chen G-W, Velu AB, et al (2016) Circulating pattern and genomic characteristics of influenza B viruses in Taiwan from 2003 to 2014. *J Formos Med Assoc* 115:510–522. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.01.017>
- Labaronne A, Milles S, Donchet A, et al (2017) Structural analysis of the complex between influenza B nucleoprotein and human importin- α . *Sci Rep* 7:17164. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17458-z>
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X (2004) Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 6:929–936. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.002>
- Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ (1980) Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1857–1861. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.4.1857>
- Lambert LC, Fauci AS (2010) Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med* 363:2036–2044. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1002842>
- Langat P, Raghwanji J, Dudas G, et al (2017) Genome-wide evolutionary dynamics of influenza B viruses on a global scale. *PLoS Pathog* 13:e1006749. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006749>
- Latham T, Galarza JM (2001) Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol* 75:6154–6165. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6154-6165.2001>
- Lauring AS, Andino R (2010) Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 6:e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Le J, Orff EJ, Fulvini AA, et al (2015) Development of high yield reassortants for influenza type B viruses and analysis of their gene compositions. *Vaccine* 33:879–884. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.027>
- Leang S-K, Kwok S, Sullivan SG, et al (2014) Peramivir and laninamivir susceptibility of circulating influenza A and B viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 8:135–139. <https://doi.org/10.1111/irv.12187>
- Lee S-Y, Kang J-O, Chang J (2019) Nucleoprotein vaccine induces cross-protective cytotoxic T lymphocytes against both lineages of influenza B virus. *Clin Exp Vaccine Res* 8:54–63. <https://doi.org/10.7774/cevr.2019.8.1.54>
- Lin YP, Gregory V, Bennett M, Hay A (2004) Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res* 103:47–52. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.02.011>
- Lin YP, Gregory V, Collins P, et al (2010) Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J Virol* 84:6769–6781. <https://doi.org/10.1128/JVI.00458-10>
- Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, et al (1999) Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J Virol* 73:4413–4426

- Liu M, Lam MK-H, Zhang Q, et al (2015) The Functional Study of the N-Terminal Region of Influenza B Virus Nucleoprotein. *PLoS ONE* 10:e0137802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137802>
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P (2007) Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* 3:1470–1476. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030151>
- Lu K-C, Chen P-Y, Huang F-L, et al (2004) Influenza B virus associated pneumonia: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan* 45:242–245
- Lugovtsev VY, Vodeiko GM, Strupczewski CM, et al (2007) Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of hemagglutinin. *Virology* 365:315–323. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.006>
- Ma J, Rubin BK, Voynow JA (2018) Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest* 154:169–176. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008>
- Marcelin G, Sandbulte MR, Webby RJ (2012) Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. *Rev Med Virol* 22:267–279. <https://doi.org/10.1002/rmv.1713>
- Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al (2000) Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74:8502–8512. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000>
- Matrosovich MN, Gambaryan AS, Tuzikov AB, et al (1993) Probing of the receptor-binding sites of the H1 and H3 influenza A and influenza B virus hemagglutinins by synthetic and natural sialosides. *Virology* 196:111–121. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1459>
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, et al (2004) Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 78:12665–12667. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004>
- McAuley JL, Corcilius L, Tan H-X, et al (2017) The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol* 10:1581–1593. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.16>
- McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, et al (2019) Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* 10:39. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039>
- McCauley J et al. (2016) Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2017: 26th± 28th September 2016. Worldwide influenza centre the Francis Crick institute Mill Hill Laboratory London. Available from: https://www.crick.ac.uk/media/326439/september_2016_interim_report.pdf. 2016
- McCullers JA (2014) The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol* 12:252–262. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3231>
- McCullers JA, Hayden FG (2012) Fatal influenza B infections: time to reexamine influenza research priorities. *J Infect Dis* 205:870–872. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir865>
- McCullers JA, Wang GC, He S, Webster RG (1999) Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J Virol* 73:7343–7348

- McKimm-Breschkin JL (2002) Neuraminidase inhibitors for the treatment and prevention of influenza. *Expert Opin Pharmacother* 3:103–112. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.2.103>
- McKimm-Breschkin JL (2013) Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses* 7 Suppl 1:25–36. <https://doi.org/10.1111/irv.12047>
- McMahon M, Kirkpatrick E, Stadlbauer D, et al (2019) Mucosal Immunity against Neuraminidase Prevents Influenza B Virus Transmission in Guinea Pigs. *MBio* 10:. <https://doi.org/10.1128/mBio.00560-19>
- Medina RA, Stertz S, Manicassamy B, et al (2013) Glycosylations in the globular head of the hemagglutinin protein modulate the virulence and antigenic properties of the H1N1 influenza viruses. *Sci Transl Med* 5:187ra70. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005996>
- Memoli MJ, Shaw PA, Han A, et al (2016) Evaluation of Antihemagglutinin and Antineuraminidase Antibodies as Correlates of Protection in an Influenza A/H1N1 Virus Healthy Human Challenge Model. *MBio* 7:e00417-00416. <https://doi.org/10.1128/mBio.00417-16>
- Mifsud EJ, Hayden FG, Hurt AC (2019) Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses. *Antiviral Res* 169:104545. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104545>
- Moa AM, Muscatello DJ, Turner RM, MacIntyre CR (2017) Epidemiology of influenza B in Australia: 2001-2014 influenza seasons. *Influenza Other Respir Viruses* 11:102–109. <https://doi.org/10.1111/irv.12432>
- Mohr PG, Deng Y-M, McKimm-Breschkin JL (2015) The neuraminidases of MDCK grown human influenza A(H3N2) viruses isolated since 1994 can demonstrate receptor binding. *Virology* 12:67. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0295-3>
- Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, et al (2006) Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2395–2402. <https://doi.org/10.1128/AAC.01339-05>
- Monto AS, Petrie JG, Cross RT, et al (2015) Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J Infect Dis* 212:1191–1199. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv195>
- Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, et al (1999) Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 282:31–35. <https://doi.org/10.1001/jama.282.1.31>
- Mosterín Höpping A, Fonville JM, Russell CA, et al (2016) Influenza B vaccine lineage selection--an optimized trivalent vaccine. *Vaccine* 34:1617–1622. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.042>
- Muneuchi J, Kanaya Y, Takimoto T, et al (2009) Myocarditis mimicking acute coronary syndrome following influenza B virus infection: a case report. *Cases J* 2:6809. <https://doi.org/10.4076/1757-1626-2-6809>
- Muyanga J, Matsuzaki Y, Sugawara K, et al (2001) Antigenic and genetic analyses of influenza B viruses isolated in Lusaka, Zambia in 1999. *Arch Virol* 146:1667–1679. <https://doi.org/10.1007/s007050170055>
- Nair H, Brooks WA, Katz M, et al (2011) Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 378:1917–1930. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61051-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61051-9)

- Nakagawa N, Kubota R, Maeda A, et al (2000) Heterogeneity of influenza B virus strains in one epidemic season differentiated by monoclonal antibodies and nucleotide sequences. *J Clin Microbiol* 38:3467–3469
- Nakagawa N, Kubota R, Maeda A, Okuno Y (2004) Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season. *J Clin Microbiol* 42:3295–3297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3295-3297.2004>
- Nakagawa N, Kubota R, Morikawa S, et al (2001a) Characterization of new epidemic strains of influenza B virus by using neutralizing monoclonal antibodies. *J Med Virol* 65:745–750
- Nakagawa N, Kubota R, Nakagawa T, Okuno Y (2001b) Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains. *J Gen Virol* 82:2169–2172. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-9-2169>
- Nakagawa N, Kubota R, Nakagawa T, Okuno Y (2003) Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the “loop.” *J Gen Virol* 84:769–773. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18756-0>
- Nakagawa N, Kubota R, Okuno Y (2005) Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus victoria group isolates in Japan. *J Clin Microbiol* 43:4212–4214. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4212-4214.2005>
- Nakagawa N, Suzuoki J, Kubota R, et al (2006) Discovery of the neutralizing epitope common to influenza B virus victoria group isolates in Japan. *J Clin Microbiol* 44:1564–1566. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1564-1566.2006>
- Nakamura K, Compans RW (1979) Host cell- and virus strain-dependent differences in oligosaccharides of hemagglutinin glycoproteins of influenza A viruses. *Virology* 95:8–23. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90397-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90397-0)
- Nakatsu S, Sagara H, Sakai-Tagawa Y, et al (2016) Complete and Incomplete Genome Packaging of Influenza A and B Viruses. *MBio* 7:. <https://doi.org/10.1128/mBio.01248-16>
- Namendys-Silva SA, González-Herrera MO, Texcocano-Becerra J, Herrera-Gómez A (2011) Acute respiratory distress syndrome caused by influenza B virus infection in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Case Rep Med* 2011:647528. <https://doi.org/10.1155/2011/647528>
- Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, et al (2009) Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* 143:147–161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010>
- Nelson MI, Edelman L, Spiro DJ, et al (2008) Molecular epidemiology of A/H3N2 and A/H1N1 influenza virus during a single epidemic season in the United States. *PLoS Pathog* 4:e1000133. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000133>
- Nelson MI, Holmes EC (2007) The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 8:196–205. <https://doi.org/10.1038/nrg2053>
- Nerome R, Hiromoto Y, Sugita S, et al (1998) Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch Virol* 143:1569–1583

- Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:121–143. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06099-5_4
- Newland JG, Romero JR, Varman M, et al (2003) Encephalitis associated with influenza B virus infection in 2 children and a review of the literature. *Clin Infect Dis* 36:e87–95. <https://doi.org/10.1086/368184>
- Ng AK-L, Lam MK-H, Zhang H, et al (2012) Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein. *J Virol* 86:6758–6767. <https://doi.org/10.1128/JVI.00073-12>
- Ng WC, Liong S, Tate MD, et al (2014) The macrophage galactose-type lectin can function as an attachment and entry receptor for influenza virus. *J Virol* 88:1659–1672. <https://doi.org/10.1128/JVI.02014-13>
- Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV (2012a) Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther (Lond)* 17:159–173. <https://doi.org/10.3851/IMP2067>
- Nguyen HT, Trujillo AA, Sheu TG, et al (2012b) Analysis of influenza viruses from patients clinically suspected of infection with an oseltamivir resistant virus during the 2009 pandemic in the United States. *Antiviral Res* 93:381–386. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.01.006>
- Ni F, Kondrashkina E, Wang Q (2013) Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin. *Virology* 446:112–122. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.035>
- Ni F, Mbawuiké IN, Kondrashkina E, Wang Q (2014) The roles of hemagglutinin Phe-95 in receptor binding and pathogenicity of influenza B virus. *Virology* 450–451:71–83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.038>
- Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, et al (2007) Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res* 8:73. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-8-73>
- Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al (2000) Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. *Lancet* 355:1845–1850. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02288-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02288-1)
- Nobusawa E, Sato K (2006) Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* 80:3675–3678. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3675-3678.2006>
- Noda T, Kawaoka Y (2010) Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Rev Med Virol* 20:380–391. <https://doi.org/10.1002/rmv.666>
- Nogales A, Martínez-Sobrido L (2016) Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. *Int J Mol Sci* 18:. <https://doi.org/10.3390/ijms18010020>
- Noh JY, Song JY, Cheong HJ, et al (2013) Laboratory surveillance of influenza-like illness in seven teaching hospitals, South Korea: 2011–2012 season. *PLoS ONE* 8:e64295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064295>
- Norway National Influenza Centre, (2017) Norway. National Influenza Centre. Influenza Epidemiological information prepared for the WHO Consultation on the Composition of Influenza Virus Vaccines for Use in the 2018 Southern Hemisphere Influenza Season Melbourne, September 2017. Accessed 27th January 2020.

<https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/influenza/influensovervaking-gml/norsk-rapport-for-whos-influenza-vaksinemote-september-2017.pdf>

- Norway National Influenza Centre, (2019) Norway. National Influenza Centre. Influenza Virological and Epidemiological Information prepared for the WHO Consultation on the Composition of Influenza Virus Vaccines for the Southern Hemisphere 2020 Geneva, September 2019. Accessed 27th January 2020. <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2019/influenza-who-rapporter/nic-norway-2018-2019-season-influenza-report-for-who.pdf>
- Nunes B, Pechirra P, Coelho A, et al (2008) Heterogeneous selective pressure acting on influenza B Victoria- and Yamagata-like hemagglutinins. *J Mol Evol* 67:427–435. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9154-9>
- Nyirenda M, Omori R, Tessmer HL, et al (2016) Estimating the Lineage Dynamics of Human Influenza B Viruses. *PLoS ONE* 11:e0166107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166107>
- Oakley AJ, Barrett S, Peat TS, et al (2010) Structural and functional basis of resistance to neuraminidase inhibitors of influenza B viruses. *J Med Chem* 53:6421–6431. <https://doi.org/10.1021/jm100621s>
- Ohishi K, Ninomiya A, Kida H, et al (2002) Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol Immunol* 46:639–644. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02746.x>
- Ohuchi M, Asaoka N, Sakai T, Ohuchi R (2006) Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes Infect* 8:1287–1293. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.008>
- Okomo-Adhiambo M, Sleeman K, Ballenger K, et al (2010) Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: a laboratory surveillance perspective. *Viruses* 2:2269–2289. <https://doi.org/10.3390/v2102269>
- Oong XY, Ng KT, Lam TT-Y, et al (2015) Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Influenza B Viruses in Malaysia, 2012–2014. *PLoS ONE* 10:e0136254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136254>
- Oong XY, Ng KT, Tan JL, et al (2017) Whole-Genome Phylogenetic Analysis of Influenza B/Phuket/3073/2013-Like Viruses and Unique Reassortants Detected in Malaysia between 2012 and 2014. *PLoS ONE* 12:e0170610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170610>
- Orsi A, Colomba GME, Pojero F, et al (2018) Trends of influenza B during the 2010–2016 seasons in 2 regions of north and south Italy: The impact of the vaccine mismatch on influenza immunisation strategy. *Hum Vaccin Immunother* 14:523–531. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1342907>
- Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, et al (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* 74:156–163. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.1.156-163.2000>
- Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, et al (2000) Influenza B virus in seals. *Science* 288:1051–1053. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1051>
- Oxford JS, Newman R, Corcoran T, et al (1991) Direct isolation in eggs of influenza A (H1N1) and B viruses with haemagglutinins of different antigenic and amino acid composition. *J Gen Virol* 72 (Pt 1):185–189. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-1-185>

- Oxford JS, Schild GC, Corcoran T, et al (1990) A host-cell-selected variant of influenza B virus with a single nucleotide substitution in HA affecting a potential glycosylation site was attenuated in virulence for volunteers. *Arch Virol* 110:37–46. <https://doi.org/10.1007/bf01310701>
- Paddock CD, Liu L, Denison AM, et al (2012) Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal influenza B virus infection. *J Infect Dis* 205:895–905. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir861>
- PAHO (2020) FluNet. PAHO. http://ais.paho.org/hiph/viz/ed_flu.asp. Accessed 5th January 2020.
- Palekar R, Rodriguez A, Avila C, et al (2019) Patterns of influenza B circulation in Latin America and the Caribbean, 2010–2017. *PLoS ONE* 14:e0219595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219595>
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61:397–410. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90276-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90276-1)
- Palese, P.S. S ML (2007) Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, 5th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2007.
- Paterson RG, Takeda M, Ohigashi Y, et al (2003) Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface. *Virology* 306:7–17. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00083-1)
- Patil KN, Bhise AB, Dakhve MR, et al (2013) Whole-genome analysis of influenza B viruses of multiple genotypes cocirculating in India. *Genome Announc* 1:. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00951-13>
- Paul Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, et al (2013) The burden of influenza B: a structured literature review. *Am J Public Health* 103:e43–51. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2012.301137>
- Peltola V, Ruuskanen O, Heikkinen T (2011) Targeting influenza vaccinations of children. *CMAJ* 183:1464–1465. <https://doi.org/10.1503/cmaj.111055>
- Peltola V, Ziegler T, Ruuskanen O (2003) Influenza A and B virus infections in children. *Clin Infect Dis* 36:299–305. <https://doi.org/10.1086/345909>
- Peng Z, Feng L, Carolyn GM, et al (2015) Characterizing the epidemiology, virology, and clinical features of influenza in China's first severe acute respiratory infection sentinel surveillance system, February 2011–October 2013. *BMC Infect Dis* 15:143. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0884-1>
- Petrova VN, Russell CA (2018) The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol* 16:47–60. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>
- Ping J, Lopes TJS, Neumann G, Kawaoka Y (2016) Development of high-yield influenza B virus vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E8296–E8305. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616530113>
- Plant EP, Ye Z (2013) Gene Constellation of Influenza Vaccine Seed Viruses. *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*. <https://doi.org/10.5772/55289>
- Pybus OG, Rambaut A, Belshaw R, et al (2007) Phylogenetic evidence for deleterious mutation load in RNA viruses and its contribution to viral evolution. *Mol Biol Evol* 24:845–852. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm001>

- Qin Y, Zhang Y, Wu P, et al (2016) Influenza vaccine effectiveness in preventing hospitalization among Beijing residents in China, 2013-15. *Vaccine* 34:2329–2333. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.068>
- Rachakonda PS, Veit M, Korte T, et al (2007) The relevance of salt bridges for the stability of the influenza virus hemagglutinin. *FASEB J* 21:995–1002. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7052hyp>
- Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, et al (2008) The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 453:615–619. <https://doi.org/10.1038/nature06945>
- Ran Z, Shen H, Lang Y, et al (2015) Domestic Pigs Are Susceptible to Infection with Influenza B Viruses. *J Virol* 89:4818–4826. <https://doi.org/10.1128/JVI.00059-15>
- Ray R, Dos Santos G, Buck PO, et al (2017) A review of the value of quadrivalent influenza vaccines and their potential contribution to influenza control. *Hum Vaccin Immunother* 13:1640–1652. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1313375>
- Reading PC, Miller JL, Anders EM (2000) Involvement of the mannose receptor in infection of macrophages by influenza virus. *J Virol* 74:5190–5197. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.11.5190-5197.2000>
- Reber AJ, Chirkova T, Kim JH, et al (2012) Immunosenescence and Challenges of Vaccination against Influenza in the Aging Population. *Aging Dis* 3:68–90
- Reed C, Chaves SS, Daily Kirley P, et al (2015) Estimating influenza disease burden from population-based surveillance data in the United States. *PLoS ONE* 10:e0118369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118369>
- Reed C, Meltzer MI, Finelli L, Fiore A (2012) Public health impact of including two lineages of influenza B in a quadrivalent seasonal influenza vaccine. *Vaccine* 30:1993–1998. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.098>
- Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J (2011) The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol* 8:207–215. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14513>
- Richard M, Ferraris O, Erny A, et al (2011) Combinatorial effect of two framework mutations (E119V and I222L) in the neuraminidase active site of H3N2 influenza virus on resistance to oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2942–2952. <https://doi.org/10.1128/AAC.01699-10>
- Rivera K, Thomas H, Zhang H, et al (1995) Probing the structure of influenza B hemagglutinin using site-directed mutagenesis. *Virology* 206:787–795. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1001>
- Roberts PC, Garten W, Klenk HD (1993) Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J Virol* 67:3048–3060
- Robertson JS, Bootman JS, Nicolson C, et al (1990) The hemagglutinin of influenza B virus present in clinical material is a single species identical to that of mammalian cell-grown virus. *Virology* 179:35–40. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90270-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90270-2)
- Robertson JS, Nicolson C, Harvey R, et al (2011) The development of vaccine viruses against pandemic A(H1N1) influenza. *Vaccine* 29:1836–1843. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.044>

- Rodriguez A, Pérez-González A, Hossain MJ, et al (2009) Attenuated strains of influenza A viruses do not induce degradation of RNA polymerase II. *J Virol* 83:11166–11174. <https://doi.org/10.1128/JVI.01439-09>
- Rodriguez A, Pérez-González A, Nieto A (2007) Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J Virol* 81:5315–5324. <https://doi.org/10.1128/JVI.02129-06>
- Rossman JS, Lamb RA (2011) Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411:229–236. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>
- Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, et al (1990) Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* 175:59–68. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90186-u](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90186-u)
- Russell CA, Jones TC, Barr IG, et al (2008) The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science* 320:340–346. <https://doi.org/10.1126/science.1154137>
- Saito T, Nakaya Y, Suzuki T, et al (2004) Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation. *J Med Virol* 74:336–343. <https://doi.org/10.1002/jmv.20178>
- Sakai T, Nishimura SI, Naito T, Saito M (2017) Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. *Sci Rep* 7:45043. <https://doi.org/10.1038/srep45043>
- Sam I-C, Su YCF, Chan YF, et al (2015) Evolution of Influenza B Virus in Kuala Lumpur, Malaysia, between 1995 and 2008. *J Virol* 89:9689–9692. <https://doi.org/10.1128/JVI.00708-15>
- Sandbulte MR, Westgeest KB, Gao J, et al (2011) Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20748–20753. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113801108>
- Sanjuán R, Domingo-Calap P (2016) Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci* 73:4433–4448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
- Santiago Pérez MI, Hervada Vidal X, Naveira Barbeito G, et al (2010) [The Epidat program]. *Rev Panam Salud Publica* 27:80–82. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892010000100012>
- Santos JJS, Finch C, Sutton T, et al (2017) Development of an Alternative Modified Live Influenza B Virus Vaccine. *J Virol* 91:. <https://doi.org/10.1128/JVI.00056-17>
- Sato M, Saito R, Sato I, et al (2008) Effectiveness of oseltamivir treatment among children with influenza A or B virus infections during four successive winters in Niigata City, Japan. *Tohoku J Exp Med* 214:113–120. <https://doi.org/10.1620/tjem.214.113>
- Seladi-Schulman J, Steel J, Lowen AC (2013) Spherical influenza viruses have a fitness advantage in embryonated eggs, while filament-producing strains are selected in vivo. *J Virol* 87:13343–13353. <https://doi.org/10.1128/JVI.02004-13>
- Seleka M, Treurnicht FK, Tempia S, et al (2017) Epidemiology of influenza B/Yamagata and B/Victoria lineages in South Africa, 2005–2014. *PLoS ONE* 12:e0177655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177655>

- Sharabi S, Drori Y, Micheli M, et al (2016) Epidemiological and Virological Characterization of Influenza B Virus Infections. *PLoS ONE* 11:e0161195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161195>
- Sharp DG, Taylor AR, McLean IW, et al (1943) ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF INFLUENZA VIRUS B (LEE STRAIN). *Science* 98:307–308. <https://doi.org/10.1126/science.98.2544.307>
- Shaw MW, Xu X, Li Y, et al (2002) Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. *Virology* 303:1–8. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1719>
- Shen J, Kirk BD, Ma J, Wang Q (2009) Diversifying selective pressure on influenza B virus hemagglutinin. *J Med Virol* 81:114–124. <https://doi.org/10.1002/jmv.21335>
- Sherry L, Smith M, Davidson S, Jackson D (2014) The N terminus of the influenza B virus nucleoprotein is essential for virus viability, nuclear localization, and optimal transcription and replication of the viral genome. *J Virol* 88:12326–12338. <https://doi.org/10.1128/JVI.01542-14>
- Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, et al (2008) Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3284–3292. <https://doi.org/10.1128/AAC.00555-08>
- Shih AC-C, Hsiao T-C, Ho M-S, Li W-H (2007) Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6283–6288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701396104>
- Shu Y, McCauley J (2017) GISAID: Global initiative on sharing all influenza data - from vision to reality. *Euro Surveill* 22:. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494>
- Skehel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, et al (1984) A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1779–1783. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.6.1779>
- Skehel JJ, Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531–569. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>
- Skowronski DM, Hamelin M-E, Janjua NZ, et al (2012) Cross-lineage influenza B and heterologous influenza A antibody responses in vaccinated mice: immunologic interactions and B/Yamagata dominance. *PLoS ONE* 7:e38929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038929>
- Skowronski DM, Hottes TS, Chong M, et al (2011) Randomized controlled trial of dose response to influenza vaccine in children aged 6 to 23 months. *Pediatrics* 128:e276-289. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2777>
- Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, et al (2004) Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305:371–376. <https://doi.org/10.1126/science.1097211>
- Sočan M, Prosenc K, Učakar V, Berginc N (2014) A comparison of the demographic and clinical characteristics of laboratory-confirmed influenza B Yamagata and Victoria lineage infection. *J Clin Virol* 61:156–160. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.018>
- Soema PC, Kompier R, Amorij J-P, Kersten GFA (2015) Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm* 94:251–263. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>

- Steel J, Lowen AC, Wang TT, et al (2010) Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio* 1:. <https://doi.org/10.1128/mBio.00018-10>
- Stevaert A, Naesens L (2016) The Influenza Virus Polymerase Complex: An Update on Its Structure, Functions, and Significance for Antiviral Drug Design. *Med Res Rev* 36:1127–1173. <https://doi.org/10.1002/med.21401>
- Stoeckle MY, Shaw MW, Choppin PW (1987) Segment-specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2703–2707. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2703>
- Su B, Wurtzer S, Rameix-Welti M-A, et al (2009) Enhancement of the influenza A hemagglutinin (HA)-mediated cell-cell fusion and virus entry by the viral neuraminidase (NA). *PLoS ONE* 4:e8495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008495>
- Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, et al (2007) Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clin Infect Dis* 44:197–202. <https://doi.org/10.1086/509925>
- Sun X, Jayaraman A, Maniprasad P, et al (2013) N-linked glycosylation of the hemagglutinin protein influences virulence and antigenicity of the 1918 pandemic and seasonal H1N1 influenza A viruses. *J Virol* 87:8756–8766. <https://doi.org/10.1128/JVI.00593-13>
- Suomalainen M (2002) Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. *Traffic* 3:705–709
- Suptawiwat O, Ninpan K, Boonarkart C, et al (2017) Evolutionary dynamic of antigenic residues on influenza B hemagglutinin. *Virology* 502:84–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.015>
- Suzuki Y (2005) Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28:399–408. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.399>
- Suzuki Y (2006) Natural selection on the influenza virus genome. *Mol Biol Evol* 23:1902–1911. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl050>
- Suzuki Y, Nei M (2002) Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* 19:501–509. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004105>
- Tabbutt S, Leonard M, Godinez RI, et al (2004) Severe influenza B myocarditis and myositis. *Pediatr Crit Care Med* 5:403–406
- Tallo VL, Kamigaki T, Tan AG, et al (2014) Estimating influenza outpatients' and inpatients' incidences from 2009 to 2011 in a tropical urban setting in the Philippines. *Influenza Other Respir Viruses* 8:159–168. <https://doi.org/10.1111/irv.12223>
- Tamerius J, Nelson MI, Zhou SZ, et al (2011) Global influenza seasonality: reconciling patterns across temperate and tropical regions. *Environ Health Perspect* 119:439–445. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002383>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

- Tan Y, Guan W, Lam TT-Y, et al (2013) Differing epidemiological dynamics of influenza B virus lineages in Guangzhou, southern China, 2009-2010. *J Virol* 87:12447–12456. <https://doi.org/10.1128/JVI.01039-13>
- Tarbet EB, Hamilton S, Vollmer AH, et al (2014) A zanamivir dimer with prophylactic and enhanced therapeutic activity against influenza viruses. *J Antimicrob Chemother* 69:2164–2174. <https://doi.org/10.1093/jac/dku127>
- Tashiro M, McKimm-Breschkin JL, Saito T, et al (2009) Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antivir Ther (Lond)* 14:751–761. <https://doi.org/10.3851/IMP1194>
- Taubenberger JK, Kash JC (2010) Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 7:440–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
- Taubenberger JK, Morens DM (2008) The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3:499–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- Te Velthuis AJW, Fodor E (2016) Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol* 14:479–493. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>
- Temoltzin-Palacios F, Thomas DB (1994) Modulation of immunodominant sites in influenza hemagglutinin compromise antigenic variation and select receptor-binding variant viruses. *J Exp Med* 179:1719–1724. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1719>
- Tewawong N, Suntronwong N, Korkong S, et al (2017a) Evidence for influenza B virus lineage shifts and reassortants circulating in Thailand in 2014-2016. *Infect Genet Evol* 47:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.010>
- Tewawong N, Suwannakarn K, Prachayangprecha S, et al (2015) Molecular epidemiology and phylogenetic analyses of influenza B virus in Thailand during 2010 to 2014. *PLoS ONE* 10:e0116302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116302>
- Tewawong N, Vichiwattana P, Korkong S, et al (2017b) Evolution of the neuraminidase gene of seasonal influenza A and B viruses in Thailand between 2010 and 2015. *PLoS ONE* 12:e0175655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175655>
- Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al (2004) Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA* 292:1333–1340. <https://doi.org/10.1001/jama.292.11.1333>
- Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 289:179–186. <https://doi.org/10.1001/jama.289.2.179>
- Tinoco YO, Azziz-Baumgartner E, Uyeki TM, et al (2017) Burden of Influenza in 4 Ecologically Distinct Regions of Peru: Household Active Surveillance of a Community Cohort, 2009-2015. *Clin Infect Dis* 65:1532–1541. <https://doi.org/10.1093/cid/cix565>
- Tivane A, Daniels R, Nguenha N, et al (2018) Antigenic and genetic characterization of influenza viruses isolated in Mozambique during the 2015 season. *PLoS ONE* 13:e0201248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201248>

- Tramuto F, Orsi A, Maida CM, et al (2016) The Molecular Epidemiology and Evolutionary Dynamics of Influenza B Virus in Two Italian Regions during 2010-2015: The Experience of Sicily and Liguria. *Int J Mol Sci* 17:549. <https://doi.org/10.3390/ijms17040549>
- Tran D, Vaudry W, Moore D, et al (2016) Hospitalization for Influenza A Versus B. *Pediatrics* 138:. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-4643>
- Treanor J (2004) Influenza vaccine--outmaneuvering antigenic shift and drift. *N Engl J Med* 350:218–220. <https://doi.org/10.1056/NEJMp038238>
- Treanor JJ, El Sahly H, King J, et al (2011) Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok®) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine* 29:7733–7739. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.128>
- Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al (2000) Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group. *JAMA* 283:1016–1024. <https://doi.org/10.1001/jama.283.8.1016>
- Trucchi C, Alicino C, Orsi A, et al (2017) Fifteen years of epidemiologic, virologic and syndromic influenza surveillance: A focus on type B virus and the effects of vaccine mismatch in Liguria region, Italy. *Hum Vaccin Immunother* 13:456–463. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1264779>
- Tsai H-P, Wang H-C, Kiang D, et al (2006) Increasing appearance of reassortant influenza B virus in Taiwan from 2002 to 2005. *J Clin Microbiol* 44:2705–2713. <https://doi.org/10.1128/JCM.02694-05>
- Tsedenbal N, Tsend-Ayush A, Badarch D, et al (2018) Influenza B viruses circulated during last 5 years in Mongolia. *PLoS ONE* 13:e0206987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206987>
- Underwood PA, Skehel JJ, Wiley DC (1987) Receptor-binding characteristics of monoclonal antibody-selected antigenic variants of influenza virus. *J Virol* 61:206–208
- Varecková E, Mucha V, Wharton SA, Kostolanský F (2003) Inhibition of fusion activity of influenza A haemagglutinin mediated by HA2-specific monoclonal antibodies. *Arch Virol* 148:469–486. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0932-1>
- Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Caldwell JB, et al (1992) The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins* 14:327–332. <https://doi.org/10.1002/prot.340140302>
- Velkov T (2013) The specificity of the influenza B virus hemagglutinin receptor binding pocket: what does it bind to? *J Mol Recognit* 26:439–449. <https://doi.org/10.1002/jmr.2293>
- Viboud C, Bjørnstad ON, Smith DL, et al (2006) Synchrony, waves, and spatial hierarchies in the spread of influenza. *Science* 312:447–451. <https://doi.org/10.1126/science.1125237>
- Vijaykrishna D, Holmes EC, Joseph U, et al (2015) The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *Elife* 4:e05055. <https://doi.org/10.7554/eLife.05055>
- Viswanathan K, Koh X, Chandrasekaran A, et al (2010) Determinants of glycan receptor specificity of H2N2 influenza A virus hemagglutinin. *PLoS ONE* 5:e13768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013768>

- Volz EM, Koelle K, Bedford T (2013) Viral phylodynamics. *PLoS Comput Biol* 9:e1002947. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002947>
- von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, et al (1993) Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363:418–423. <https://doi.org/10.1038/363418a0>
- Vreede FT, Chan AY, Sharps J, Fodor E (2010) Mechanisms and functional implications of the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells. *Virology* 396:125–134. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.003>
- Vreede FT, Fodor E (2010) The role of the influenza virus RNA polymerase in host shut-off. *Virulence* 1:436–439. <https://doi.org/10.4161/viru.1.5.12967>
- Wagner R, Wolff T, Herwig A, et al (2000) Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol* 74:6316–6323. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6316-6323.2000>
- Walther T, Karamanska R, Chan RWY, et al (2013) Glycomic analysis of human respiratory tract tissues and correlation with influenza virus infection. *PLoS Pathog* 9:e1003223. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003223>
- Wang C-C, Chen P-Y, Wang J-D, et al (2009) Clinical and laboratory analysis of influenza B infection in children in Taichung, Taiwan during the 2006-2007 flu season. *Pediatr Neonatol* 50:54–58. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(09\)60033-4](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(09)60033-4)
- Wang Q, Cheng F, Lu M, et al (2008) Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J Virol* 82:3011–3020. <https://doi.org/10.1128/JVI.02477-07>
- Wang Q, Tian X, Chen X, Ma J (2007) Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16874–16879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708363104>
- Wang Y-F, Chang C-F, Chi C-Y, et al (2012) Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features. *J Med Virol* 84:679–685. <https://doi.org/10.1002/jmv.23219>
- Webster RG, Bean WJ (1978) Genetics of influenza virus. *Annu Rev Genet* 12:415–431. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.12.120178.002215>
- Wei C-J, Boyington JC, Dai K, et al (2010) Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Sci Transl Med* 2:24ra21. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000799>
- Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, et al (2001) Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J* 20:127–133. <https://doi.org/10.1097/00006454-200102000-00002>
- WHO (2013) WHO | Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-14 northern hemisphere influenza season. In: WHO. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/. Accessed 15 Sep 2019
- WHO, (2016) WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season, Accessed 25th January 2020.

- WHO (2016) WHO - Weekly Epidemiological Record. <https://www.who.int/wer/2016/en/>. Accessed 4th January 2020.
- WHO (2014) WHO | Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014 southern hemisphere influenza season. In: WHO. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_south/en/. Accessed 14 Sep 2019
- WHO (2015) WHO | Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season. In: WHO. http://www.who.int/entity/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_16_north/en/index.html. Accessed 14 Sep 2019
- WHO (2019) https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/. Access December 2019
- WHO (2020a) WHO Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza. https://www.who.int/influenza/resources/documents/influenza_surveillance_manual/en/. Accessed on 4th January 2020.
- WHO (2020b) WHO. Flunet. https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/. Accessed 5th January 2020.
- WHO, (2017) WHO. https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/WHO_information_for_the_molecular_detection_of_influenza_viruses_20171023_Final.pdf?ua=1. Accessed 17th January 2020.
- WHO, (2011) World Health Organization Global Influenza Surveillance Network. WHO-GISN. Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza. Geneva, Switzerland: WHO Press;2011.
- WHO, (2020) WHO recommendations on the composition of influenza virus vaccines. <https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>. Accessed 31st January 2020.
- WHO, Memorandum (1980) A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* 58:585–591
- Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ (1981) Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289:373–378. <https://doi.org/10.1038/289373a0>
- Wong CM, Yang L, Chan KP, et al (2006) Influenza-associated hospitalization in a subtropical city. *PLoS Med* 3:e121. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030121>
- Wong S-S, Webby RJ (2013) Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev* 26:476–492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>
- Wright, P N G; Kawaoka, Y (2007) Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*, 5th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Eds.; LippincottWilliams &Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2007.
- Wright PF (2006) The use of inactivated influenza vaccine in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 17:200–205. <https://doi.org/10.1053/j.spid.2006.08.004>

- Wright PF, Neuman G, Kawaoka Y. (2007) Orthomyxoviruses, p 1691– 1740. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed), *Fields virology*, 5th ed, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Wu N-H, Yang W, Beineke A, et al (2016) The differentiated airway epithelium infected by influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated cells. *Sci Rep* 6:39668. <https://doi.org/10.1038/srep39668>
- Xu J, Davis CT, Christman MC, et al (2012) Evolutionary history and phylodynamics of influenza A and B neuraminidase (NA) genes inferred from large-scale sequence analyses. *PLoS ONE* 7:e38665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038665>
- Xu X, Lindstrom SE, Shaw MW, et al (2004) Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. *Virus Res* 103:55–60. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.02.013>
- Yamashita M, Krystal M, Fitch WM, Palese P (1988) Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* 163:112–122. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90238-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90238-3)
- Yang J, Liu S, Du L, Jiang S (2016) A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action. *Rev Med Virol* 26:242–250. <https://doi.org/10.1002/rmv.1879>
- Yang J-R, Huang Y-P, Chang F-Y, et al (2012) Phylogenetic and evolutionary history of influenza B viruses, which caused a large epidemic in 2011-2012, Taiwan. *PLoS ONE* 7:e47179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047179>
- Yang X, Steukers L, Forier K, et al (2014) A beneficiary role for neuraminidase in influenza virus penetration through the respiratory mucus. *PLoS ONE* 9:e110026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110026>
- Yen H-L, Hoffmann E, Taylor G, et al (2006) Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol* 80:8787–8795. <https://doi.org/10.1128/JVI.00477-06>
- Yewdell JW, Caton AJ, Gerhard W (1986) Selection of influenza A virus adsorptive mutants by growth in the presence of a mixture of monoclonal antihemagglutinin antibodies. *J Virol* 57:623–628
- Yewdell JW, Taylor A, Yellen A, et al (1993) Mutations in or near the fusion peptide of the influenza virus hemagglutinin affect an antigenic site in the globular region. *J Virol* 67:933–942
- York IA, Stevens J, Alymova IV (2019) Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Biosci Rep* 39:. <https://doi.org/10.1042/BSR20171505>
- Yu H, Alonso WJ, Feng L, et al (2013) Characterization of regional influenza seasonality patterns in China and implications for vaccination strategies: spatio-temporal modeling of surveillance data. *PLoS Med* 10:e1001552. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001552>
- Yusuf K, Soraisham AS, Fonseca K (2007) Fatal influenza B virus pneumonia in a preterm neonate: case report and review of the literature. *J Perinatol* 27:623–625. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211802>
- Zhang C, Zhu N, Xie Z, et al (2013) Viral etiology and clinical profiles of children with severe acute respiratory infections in China. *PLoS ONE* 8:e72606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072606>

Zhang X, Chen S, Yang D, et al (2015) Role of stem glycans attached to haemagglutinin in the biological characteristics of H5N1 avian influenza virus. *J Gen Virol* 96:1248–1257.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.000082>

Zhu N, Li P, Yu J, et al (2013) Molecular characterization of influenza B viruses isolated in east-central China in 2009-2010. *Virus Genes* 46:28–38. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0826-6>

Zinder D, Bedford T, Gupta S, Pascual M (2013) The roles of competition and mutation in shaping antigenic and genetic diversity in influenza. *PLoS Pathog* 9:e1003104.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003104>

Anexos

Anexo 1. Números de accesos en GISAID.

Se detallan los números de acceso a las secuencias de los genes parciales de HA y NA de las muestras aisladas en Uruguay durante el período 2010 a 2019. Los símbolos “+” y en color rojo se indican secuencias obtenidas en este trabajo y con símbolo “*” se indican las secuencias uruguayas obtenidas de la base de datos GISAID. Con símbolo “—” se indican las secuencias que no pudieron ser obtenidas.

Cepa	Números de acceso	
	Gen HA	Gen NA
+ B/Uruguay/1301/2010	EPI17226540	EPI17226539
+ B/Uruguay/1861/2010	EPI1705811	EPI1705812
+ B/Uruguay/1350/2010	EPI1705813	EPI1705814
+ B/Uruguay/793/2010	EPI1705809	EPI1705810
+ B/Uruguay/218/2010	EPI1705807	EPI1705808
* B/Uruguay/1039/2010	EPI291653	EPI291652
* B/Uruguay/581/2010	EPI291662	EPI291661
* B/Uruguay/517/2010	EPI291659	EPI291658
* B/Uruguay/1050/2010	EPI291656	EPI291655
+ B/Uruguay/257/2012	EPI1694132	—
+ B/Uruguay/488/2012	EPI1694428	EPI1694429
+ B/Uruguay/312/2012	EPI1694430	—
+ B/Uruguay/236/2012	EPI1694435	EPI1694436
+ B/Uruguay/252/2012	EPI1694437	EPI1694438
+ B/Uruguay/266/2012	EPI1694439	EPI1694440
+ B/Uruguay/276/2012	EPI1694441	EPI1694442
+ B/Uruguay/515/2012	EPI1694443	EPI1694444
+ B/Uruguay/311/2012	EPI1694445	—
* B/Uruguay/153/2012	EPI397176	EPI397175
* B/Uruguay/358/2012	EPI397496	EPI397495
+ B/Uruguay/864/2013	EPI1694446	—
* B/Uruguay/177/2013	EPI468104	EPI468103
+ B/Uruguay/406/2014	EPI1694447	EPI1694448
+ B/Uruguay/578/2014	EPI1694449	EPI1694450
+ B/Uruguay/422/2014	EPI1694451	EPI1694452
* B/Uruguay/143/2014	EPI543636	EPI543635
+ B/Uruguay/105/2015	EPI1694453	—
+ B/Uruguay/94/2015	EPI1694454	—
+ B/Uruguay/396/2015	EPI1694455	—
+ B/Uruguay/372/2015	EPI1694456	EPI1694457
+ B/Uruguay/309/2015	EPI1694458	EPI1694459
+ B/Uruguay/289/2015	EPI1694460	EPI1694461
+ B/Uruguay/342/2015	—	EPI1694462
+ B/Uruguay/345/2015	EPI1694463	EPI1694464
+ B/Uruguay/335/2015	EPI1694465	EPI1694466
+ B/Uruguay/384/2015	EPI1694467	—
* B/Uruguay/102/2015	EPI662236	EPI662235
* B/Uruguay/98/2015	EPI662229	EPI662228
* B/Uruguay/02/2016	EPI826797	EPI826796
+ B/Uruguay/934/2016	EPI1694468	—
+ B/Uruguay/789/2016	EPI1694469	EPI1694470
+ B/Uruguay/830/2017	EPI1694471	EPI1694472
+ B/Uruguay/700/2017	EPI1694473	EPI1694474
+ B/Uruguay/659/2017	EPI1694475	—
+ B/Uruguay/1064/2017	EPI1694477	—
+ B/Uruguay/673/2017	—	EPI1694493
* B/Uruguay/527/2017	EPI1053039	EPI1053038
* B/Uruguay/403/2017	EPI1053031	EPI1053030
* B/Uruguay/338/2017	EPI1053047	EPI1053046
* B/Uruguay/126/2017	EPI1034164	EPI1034163
* B/Uruguay/119/2017	EPI1034148	EPI1034147
* B/Uruguay/113/2017	EPI1034141	EPI1034140
* B/Uruguay/106/2017	EPI1034133	EPI1034132
* B/Uruguay/511/2017	EPI1053015	EPI1053014
* B/Uruguay/383/2017	EPI1053055	EPI1053054
* B/Uruguay/379/2017	EPI1053023	EPI1053022
* B/Uruguay/140/2017	EPI1034188	EPI1034187
* B/Uruguay/138/2017	EPI1034180	EPI1034179
* B/Uruguay/137/2017	EPI1034172	EPI1034171
* B/Uruguay/124/2017	EPI1034156	EPI1034155
+ B/Uruguay/1054/2018	EPI1694495	EPI1694496
+ B/Uruguay/1005/2018	EPI1694497	EPI1694498
+ B/Uruguay/816/2018	EPI1694499	EPI1694500
+ B/Uruguay/727/2018	EPI1694501	EPI1694502
+ B/Uruguay/1070/2018	EPI1694503	EPI1694505
+ B/Uruguay/899/2018	EPI1311468	—
+ B/Uruguay/835/2018	EPI1311467	—
+ B/Uruguay/626/2018	EPI1311466	—
* B/Uruguay/571/2018	EPI1312796	EPI1312795
* B/Uruguay/553/2018	EPI1312804	EPI1312803
* B/Uruguay/33/2018	EPI1312812	EPI1312811
+ B/Uruguay/708/2019	EPI1694770	EPI1694764
+ B/Uruguay/748/2019	EPI1694769	EPI1694762
+ B/Uruguay/753/2019	EPI1694768	EPI1694763
+ B/Uruguay/153/2019	EPI1738132	—

Anexo 2. Sustituciones de aa en HA1 del linaje B/Victoria en cepas uruguayas.

Se describen los cambios de aa encontrados en la región HA1 del gen HA para el linaje B/Victoria durante el período 2010 a 2019, los análisis se hicieron en referencia a la vacunal *B/Brisbane/60/2008*. Sólo se indican los cambios para las cepas de Uruguay, el análisis completo se encuentra disponible en el Anexo 6. Con símbolo "." se indican aquellas posiciones sin cambios y con "-" las posiciones en las cuales no fue posible determinar el aa. La abreviatura "del" corresponde a delección. En color azul se destacan los sitios más prevalentes y en verde se destacan las mutaciones únicas encontradas en las cepas de Uruguay.

	52	58	87	106	117	121	129	144	146	162	163	164	169	175	180	252
B/Brisbane/60/2008	K	L	V	Q	I	T	N	P	I	K	N	D	A	I	I	V
B/Uruguay/753/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Uruguay/708/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Uruguay/153/2019	-	-	-	-	-	-	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Uruguay/748/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Uruguay/137/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/138/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/140/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/511/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/379/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/383/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/830/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/659/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/700/2017	.	.	A	.	V	.	D	V	.	.
B/Uruguay/124/2017	V	.	D
B/Uruguay/02/2016	D
B/Uruguay/789/2016	V	.	D
B/Uruguay/934/2016	V	N	D	M
B/Uruguay/98/2015	D
B/Uruguay/102/2015	D
B/Uruguay/335/2015	D
B/Uruguay/345/2015	.	.	.	R	.	.	D
B/Uruguay/384/2015	D
B/Uruguay/289/2015	D
B/Uruguay/105/2015	D
B/Uruguay/396/2015	D
B/Uruguay/94/2015	V	.	.	.	E	.	.	.
B/Uruguay/406/2014	V	.	.	.	E	.	.	.
B/Uruguay/578/2014	V	.	.	.	E	.	.	.
B/Uruguay/864/2013	V	.	.	.	E	.	.	.
B/Uruguay/177/2013	D	.	V
B/Uruguay/257/2012	L	V
B/Uruguay/312/2012	V
B/Uruguay/236/2012	R	V
B/Uruguay/311/2012	R	V
B/Uruguay/581/2010	.	P	V
B/Uruguay/1301/2010	.	P	V
B/Uruguay/1039/2010	.	P	V
B/Uruguay/517/2010	.	P	V	.	.	E

Anexo 3. Sustituciones de aa en HA1 del linaje B/Yamagata en cepas uruguayas.

Se describen los cambios de aa encontrados en la región HA1 del gen HA para el linaje B/Yamagata durante el período 2010 a 2019, los análisis se hicieron en referencia a la vacunal *B/Puket/3073/2013*. Sólo se indican los cambios para las cepas de Uruguay, el análisis completo se encuentra disponible en el Anexo 7. Con símbolo "." se indican aquellas posiciones sin cambios. En color azul se destacan los sitios más prevalentes seguido por los sitios destacados en verde. En color amarillo se destaca la mutación única encontrada entre las cepas de Uruguay.

	48	83	108	116	124	150	165	172	181	188	198	202	229	232	251	298	312
B/Phuket/3073/2013	R	I	P	K	V	I	Y	L	T	T	T	S	D	D	M	E	K
B/Uruguay/727/2018	Q	N	V	.	.
B/Uruguay/816/2018	Q	N	V	.	.
B/Uruguay/1005/2018	Q	N	V	.	.
B/Uruguay/1054/2018	Q	N	V	.	.
B/Uruguay/033/2018	Q	N	V	.	.
B/Uruguay/1070/2018	V	.	Q	N	.	V	.	.
B/Uruguay/553/2018	Q	N	.	V	.	.
B/Uruguay/626/2018	Q	N	.	V	.	.
B/Uruguay/899/2018	Q	N	.	V	.	.
B/Uruguay/835/2018	Q	N	.	V	.	.
B/Uruguay/571/2018	Q	V	.	.
B/Uruguay/1064/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/106/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/113/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/527/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/119/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/403/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/338/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/126/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/309/2015	Q	V	.	.
B/Uruguay/372/2015	Q	V	.	.
B/Uruguay/143/2014	.	V	Q
B/Uruguay/422/2014	Q
B/Uruguay/276/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	N	G	.	.	K	E
B/Uruguay/153/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	N	G	.	.	K	E
B/Uruguay/252/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	N	G	.	.	K	E
B/Uruguay/488/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	N	G	.	.	K	E
B/Uruguay/515/2012	K	.	A	N	A	S	N	.	A	.	.	N	G	.	.	K	E
B/Uruguay/358/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	N	G	.	.	K	E
B/Uruguay/266/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	N	G	.	.	K	E
B/Uruguay/1350/2010	.	.	.	N	K	.	.	N	.	.	.	K	E
B/Uruguay/793/2010	.	.	.	N	K	.	.	N	.	.	.	K	E
B/Uruguay/218/2010	.	.	.	N	K	.	I	N	.	.	.	K	E
B/Uruguay/1050/2010	.	.	.	N	K	.	.	N	.	.	.	K	E
B/Uruguay/1861/2010	.	.	.	N	K	A	.	N	.	.	.	K	E

Anexo 4. Sustituciones de aa en NA del linaje B/Victoria en cepas uruguayas.

Se describen los cambios de aa encontrados en la región parcial del gen HA para el linaje B/Victoria durante el período 2010 a 2019, los análisis se hicieron en referencia a la vacunal *B/Brisbane/60/2008*. Sólo se indican los cambios para las cepas de Uruguay, el análisis completo se encuentra disponible en el Anexo 8. Con símbolo "." se indican aquellas posiciones sin cambios y con "-" las posiciones en las cuales no fue posible determinar el aa. La abreviatura "del" corresponde a delección. En color azul se destacan los sitios más prevalentes y en verde se destacan las mutaciones únicas encontradas en las cepas de Uruguay.

	27	45	46	51	59	60	68	73	74	75	94	106	120	157	198	199	220	290	295	320	329	340	345	358	371	377	384	395	401	403
B/Brisbane/60/2008	S	I	T	P	N	V	T	L	L	L	K	T	I	I	N	N	K	A	S	D	N	N	S	E	K	M	D	A	V	M
B/Uruguay/708/2019	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.
B/Uruguay/748/2019	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.
B/Uruguay/753/2019	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.
B/Uruguay/137/2017	A	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/138/2017	A	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/140/2017	A	.	I	.	.	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/511/2017	A	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/379/2017	A	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/830/2017	A	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/700/2017	A	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/383/2017	A	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/673/2017	I	A	.	.	F	.	I	V	.	.	.	N	.	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	I	.
B/Uruguay/124/2017	R	.	.	D	N	K
B/Uruguay/789/2016	V	V	.	.	N	V	R	.	.	D	.	K	.	.	G	.	.	
B/Uruguay/02/2016	.	T	I	R	.	.	D	.	K	I
B/Uruguay/98/2015	.	T	I	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/102/2015	.	T	I	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/289/2015	.	.	.	K	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/342/2015	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/345/2015	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/335/2015	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/406/2014	F	S	.	.	.	R	.	.	D	N	K	
B/Uruguay/578/2014	F	S	.	.	.	R	.	.	D	N	K	
B/Uruguay/177/2013	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/236/2012	D
B/Uruguay/581/2010	.	.	S	.	.	.	F	D	D	V	.
B/Uruguay/1039/2010	L	.	S	.	.	.	F	.	R	D	D
B/Uruguay/517/2010	L	.	S	R	D	N	D
B/Uruguay/1301/2010	F	.	R	A	D	D	K	.	.

Anexo 5. Sustituciones de aa en NA del linaje B/Yamagata en cepas uruguayas.

Se describen los cambios de aa encontrados en la región parcial del gen NA para el linaje B/Yamagata durante el período 2010 a 2019, los análisis se hicieron en referencia a la vacunal *B/Pucket/3073/2013*. Sólo se indican los cambios para las cepas de Uruguay, el análisis completo se encuentra disponible en el Anexo 9. Con símbolo “.” se indican aquellas posiciones sin cambios y con “-” las posiciones en las cuales no fue posible determinar el aa. En color azul se destacan los sitios más prevalentes.

	42	45	46	49	53	55	57	59	60	67	68	73	76	78	88	91	99	106	115	120	125	171	175	186	248	295	320	340	342	343	371	372	373	395	
B/Phuket/3073/2013	R	V	T	I	D	A	A	N	V	A	T	P	P	P	P	P	S	T	I	I	K	I	A	R	I	S	K	D	D	E	K	T	K	A	
B/Uruguay/1005/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	N	Q	S
B/Uruguay/816/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	.	Q	S
B/Uruguay/033/2018	.	.	.	M	M	K	.	R	.	Q	S
B/Uruguay/727/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	.	Q	S
B/Uruguay/1054/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	.	Q	S
B/Uruguay/571/2018	.	.	.	M	M	.	K	K	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/553/2018	.	.	.	M	Q	M	.	.	K	K	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/1070/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/403/2017	A	V	M	N	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/113/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/119/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/338/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/106/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/126/2017	A	V	N	N	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/527/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.
B/Uruguay/372/2015	-	-	-	-	-	-	R	V	.	.	T	N
B/Uruguay/309/2015	-	-	-	-	-	-	K	F	S	V	N
B/Uruguay/422/2014	I
B/Uruguay/143/2014	.	.	N
B/Uruguay/252/2012	-	-	-	-	-	-	-	.	.	A	L	I	.	.	T	.	.	K	V	R	E	.	.	.	K
B/Uruguay/515/2012	-	-	-	-	-	-	-	.	.	A	L	I	.	.	T	.	T	K	V	R	E	.	.	.	K
B/Uruguay/153/2012	Q	I	.	.	.	T	.	.	.	A	L	I	.	.	T	.	.	K	V	R	E	.	.	.	K
B/Uruguay/358/2012	Q	I	.	.	.	T	.	.	.	A	L	I	.	.	T	.	.	K	V	R	E	.	.	.	K
B/Uruguay/266/2012	-	-	-	-	-	-	-	.	.	A	L	I	.	.	T	.	.	K	V	R	E	.	.	.	K
B/Uruguay/276/2012	-	-	-	-	-	-	K	N	.	A	L	.	.	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	K	V	R	E	.	.	.	K
B/Uruguay/488/2012	-	-	-	-	-	-	-	.	.	A	L	I	.	.	T	.	.	K	V	R	E	.	.	.	K
B/Uruguay/793/2010	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	L	I	E	N	.	K
B/Uruguay/1861/2010	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	L	I	E	N	.	K
B/Uruguay/218/2010	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	L	I	.	.	.	T	E	N	.	K
B/Uruguay/1050/2010	.	I	.	.	G	L	I	E	N	.	K
B/Uruguay/1350/2010	-	-	-	-	-	-	-	C	.	.	L	E	N	.	K

Anexo 6. Sustituciones de aminoácidos en HA1 del linaje B/Victoria.

La cepa vacunal de referencia utilizada para el análisis se indica en negrita. Se utilizan cepas aisladas en Uruguay y seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. Con símbolo “.” se indican aquellas posiciones sin cambios y con símbolo “-” las posiciones para las cuales no se pudo determinar el aa. La abreviatura “del” indica la palabra delección.

	52	58	87	106	117	121	129	144	146	162	163	164	169	175	180	252
B/Brisbane/60/2008	K	L	V	Q	I	T	N	P	I	K	N	D	A	I	I	V
B/Colorado/06/2017	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Washington/02/2019	V	.	D	.	.	del	del	del
B/Uruguay/753/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Uruguay/708/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Uruguay/153/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Uruguay/748/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/SaoPaulo/1211465/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Bahia/735/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Santiago/48735/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Santiago/62161/2019	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Brazil/2470/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Brazil/4835/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Paraguay/7301/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Paraguay/0620/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	M
B/Santiago/34511/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Argentina/9/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Santiago/51375/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Argentina/13738/2018	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Brazil/6128/2017	V	.	D
B/Argentina/13339/2017	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Argentina/2110/2017	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Brazil/4558/2017	V	.	D
B/Santiago/54067/2017	V	.	G	.	.	del	del	.	.	.	V	.
B/Santiago/25385/2017	V	.	D
B/Uruguay/137/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/138/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/140/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/511/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/379/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/383/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/830/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/659/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/700/2017	.	.	A	.	V	.	D	↙	.	.
B/Uruguay/124/2017	V	.	D	M
B/Paraguay/8037/2017	V	.	D	M
B/Brazil/0496/2016	V	.	D
B/Ceara/1449521EC/2016	V	.	D
B/Uruguay/02/2016	V	.	D
B/Uruguay/789/2016	V	.	D
B/Uruguay/934/2016	V	N	D	M
B/Santiago/44313/2016	V	.	D
B/Santiago/45998/2016	V	.	D
B/Paraguay/2377/2016	V	.	D
B/Paraguay/5894/2016	V	.	D
B/Argentina/268/2016	V	.	D	M
B/Paraguay/1131/2015	V	.	D	.	V
B/Paraguay/5133/2015	V	.	D	.	V
B/Valparaiso/81181/2015	V	.	D	.	V
B/Santiago/80460/2015	V	.	D	.	V	M
B/Argentina/11461/2015	V	.	D	.	V
B/Brazil/80287/2015	V	.	D	.	V
B/Brazil/6297/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/98/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/102/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/335/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/345/2015	.	.	.	R	V	.	D	.	V
B/Uruguay/384/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/289/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/105/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/396/2015	V	.	D	.	V
B/Uruguay/94/2015	V	.	D	.	V	.	.	E
B/BuenosAires/10986152/2014	V	.	D	.	V
B/Paraguay/4674/2014	V	.	D	.	V
B/Paraguay/672/2014	V	.	D	.	V	.	.	E
B/Uruguay/406/2014	V	.	D	.	V	.	.	E
B/Uruguay/578/2014	V	.	D	.	V	.	.	E
B/Brazil/2920/2014	V	.	D	.	V
B/Santiago/69223/2014	V	.	D	.	V
B/Concepcion/264/2014	V	.	D	.	V
B/Brazil/5137/2014	V	.	D	.	V
B/Argentina/154/2014	V	.	D	.	V
B/Brazil/3742/2013	V	.	D	.	V	.	.	E
B/Brazil/6004/2013	V	.	D	.	V
B/PuertoMontt/81199/2013	V	A	D	.	V	.	D
B/Santiago/82832/2013	V	.	G	.	V
B/Uruguay/864/2013	V	.	D	.	V	.	.	E
B/Uruguay/177/2013	V	.	D	.	V
B/Santiago/34960/2012	V	.	D	.	V
B/Santiago/49303/2012	V	.	D	.	V
B/BuenosAires/770/2012	V	.	D	.	V
B/Formosa/V2367/2012	V	.	D	.	V	.	.	E
B/Brazil/0944/2012	V	.	D	.	V
B/Paraguay/190/2012	V	.	D	.	V
B/Paraguay/252/2012	V	.	D	.	V
B/Uruguay/257/2012	V	.	D	L	V
B/Uruguay/312/2012	V	.	D	.	V
B/Uruguay/236/2012	R	.	.	.	V	.	D	.	V
B/Uruguay/311/2012	R	.	.	.	V	.	D	.	V
B/Santiago/14887/2010	.	P	.	.	V	.	D	.	V
B/Paraguay/3081/2010	.	P	.	.	V	.	D	.	V
B/Uruguay/581/2010	.	P	.	.	V	.	D	.	V
B/Uruguay/1301/2010	.	P	.	.	V	.	D	.	V
B/Uruguay/1039/2010	.	P	.	.	V	.	D	.	V
B/Uruguay/517/2010	.	P	.	.	V	.	D	.	V	.	P	E
B/Argentina/159/2010	V	.	D	.	V
B/Argentina/211/2010	V	.	D	.	V

Anexo 7. Sustituciones de aminoácidos en HA1 del linaje B/Yamagata

La cepa vacunal de referencia utilizada para el análisis se indica en negrita. Se utilizan cepas aisladas en Uruguay y seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. Con símbolo “.” se indican aquellas posiciones sin cambios y con símbolo “-” las posiciones para las cuales no se pudo determinar el aa.

	48	83	108	116	124	150	165	172	181	188	198	202	229	232	251	298	312
B/Phuket/3073/2013	R	I	P	K	V	I	Y	L	T	T	T	S	D	D	M	E	K
B/Wisconsin/01/2010	.	.	.	N	E
B/Massachusetts/02/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	I	N	G	.	.	K	E
B/Santiago/64840/2019	Q	Z	V	.	.
B/Santiago/63228/2019	Q	Z	V	.	.
A/EspiritoSanto/87/2019	Q	Z	V	.	.
B/Parana/27/2019	Q	Z	V	.	.
B/Uruguay/727/2018	Q	Z	V	.	.
B/Uruguay/816/2018	Q	Z	V	.	.
B/Uruguay/1005/2018	Q	Z	V	.	.
B/Uruguay/1054/2018	Q	Z	V	.	.
B/Uruguay/033/2018	Q	Z	V	.	.
B/Uruguay/1070/2018	V	.	Q	Z	V	V	.	.
B/Uruguay/553/2018	Q	Z	V	V	.	.
B/Uruguay/626/2018	Q	Z	V	V	.	.
B/Uruguay/899/2018	Q	Z	V	V	.	.
B/Uruguay/835/2018	Q	Z	V	V	.	.
B/Uruguay/571/2018	Q	V	V	.	.
B/Argentina/14/2018	Q	V	.	.
B/Argentina/13785/2018	Q	Z	V	.	.
B/Brazil/7103/2018	Q	V	.	.
B/Brazil/0379/2018	Q	V	.	.
B/Paraguay/6288/2018	Q	V	.	.
B/Paraguay/0336/2018	Q	V	.	.
B/Santiago/53060/2018	Q	Z	V	.	.
B/Santiago/34517/2018	Q	V	.	.
B/Santiago/75265/2017	Q	V	.	.
B/Santiago/81374/2017	Q	V	.	.
B/Argentina/1744/2017	Q	V	.	.
B/Argentina/13252/2017	Q	V	.	.
B/Paraguay/3099/2017	Q	V	.	.
B/Paraguay/8072/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/1064/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/106/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/113/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/527/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/119/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/403/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/338/2017	Q	V	.	.
B/Uruguay/126/2017	Q	V	.	.
B/Brazil/8134/2017	Q	V	.	.
B/Brazil/3889/2017	V	.	Q	V	.	.
B/Pucon/75541/2015	Q	V	.	.
B/Paraguay/0905/2015	Q	V	.	.
B/Paraguay/6712/2015	Q	V	.	.
B/Santiago/75552/2015	Q	Z	V	.	.
B/Uruguay/309/2015	Q	V	.	.
B/Uruguay/372/2015	Q	V	.	.
B/Brazil/0589/2015	Q	V	.	.
B/Brazil/36401/2015	Q	V	.	.
B/Argentina/11616/2015	Q	V	.	.
B/Santiago/73755/2014	Q	V	.	.
B/Brazil/1716/2014	Q	V	.	.
B/Brazil/2282/2014	Q	V	.	.
B/Santiago/71933/2014	Q	V	.	.
B/Uruguay/143/2014	.	V	Q	V	.	.
B/Uruguay/422/2014	Q	V	.	.
B/SantaFe/1079/2014	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/SantaFe/1149/2014	Q
B/Paraguay/2429/2014	Q
B/Paraguay/0068/2014	.	.	.	N	K	.	.	Z
B/Natal/119888/2012	.	.	.	N	K
B/Santiago/11896/2012	.	.	.	N	A	.	.	Q	.	.	.	Z	.	.	V	.	E
B/Santiago/38204/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Tucuman/A285/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/BuenosAires/8833/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Uruguay/276/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Uruguay/153/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Uruguay/252/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Uruguay/488/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Uruguay/515/2012	K	.	A	N	A	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Uruguay/358/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Uruguay/266/2012	K	.	A	N	.	S	N	.	A	.	.	Z	G	.	.	K	E
B/Brazil/6360/2010	.	.	.	N	K	.	.	Z	.	.	.	K	E
B/Brazil/1000/2010	.	.	.	N	K	.	.	Z	.	.	.	K	E
B/Uruguay/1350/2010	.	.	.	N	K	.	.	Z	.	.	.	K	E
B/Uruguay/793/2010	.	.	.	N	K	.	.	Z	.	.	.	K	E
B/Uruguay/218/2010	.	.	.	N	K	.	I	Z	.	.	.	K	E
B/Uruguay/1050/2010	.	.	.	N	K	.	.	Z	.	.	.	K	E
B/Uruguay/1861/2010	.	.	.	N	K	A	.	Z	.	.	.	K	E
B/Santiago/15183/2010	.	.	.	N	K	.	.	Z	.	.	.	K	E
B/Paraguay/1453/2010	.	.	.	N	K	.	A	Z	.	.	.	K	E

Anexo 8. Sustituciones de aminoácidos en NA del linaje B/Victoria

La cepa vacunal de referencia utilizada para el análisis se indica en negrita. Se utilizan cepas aisladas en Uruguay y seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. Con símbolo “.” se indican aquellas posiciones sin cambios y con símbolo “-” las posiciones para las cuales no se pudo determinar el aa.

	27	45	46	51	59	60	68	73	74	75	94	106	120	157	198	199	220	290	295	320	329	340	345	358	371	377	384	395	401	403
B/Brisbane/60/2008	S	I	T	P	N	V	T	L	L	L	K	T	I	I	N	N	K	A	S	D	N	N	S	E	K	M	D	A	V	M
B/Colorado/06/2017	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G
B/Washington/02/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	T	.	.	.
B/Santiago/48735/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G
B/Santiago/62161/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G
B/Uruguay/708/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Uruguay/748/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Uruguay/753/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/SaoPaulo/12114651AL/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Bahia/735/2019	V	.	.	.	N	R	.	.	D	N	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Paraguay/0620/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Paraguay/7301/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Brazil/4835/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Brazil/2470/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Argentina/9/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Argentina/13738/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Santiago/51375/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	V	.	.	I
B/Santiago/34511/2018	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	V	.	.	.
B/Argentina/2110/2017	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Argentina/13339/2017	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Santiago/54067/2017	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	Q	.	G	D	.	.	.
B/Santiago/25385/2017	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Brazil/6128/2017	F	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Brazil/4558/2017	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Uruguay/137/2017	A	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/138/2017	A	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/140/2017	A	.	I	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/511/2017	A	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/379/2017	A	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/830/2017	A	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/700/2017	A	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/383/2017	A	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/673/2017	I	A	.	F	.	.	.	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	I
B/Uruguay/124/2017	V	R	.	.	D	N	K
B/Paraguay/8037/2017	V	.	.	.	N	R	.	.	D	N	K
B/Ceara/144952IEC/2016	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Brazil/0496/2016	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Santiago/44313/2016	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Santiago/45998/2016	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Paraguay/2377/2016	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Paraguay/5894/2016	F	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Uruguay/789/2016	V	V	.	.	N	V	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Uruguay/02/2016	.	T	I	V	R	.	.	D	.	K	I
B/Argentina/268/2016	V	.	.	.	N	R	.	.	D	N	K
B/Paraguay/1131/2015	V	R	.	.	D	.	K
B/Paraguay/5133/2015	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Argentina/11461/2015	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Brazil/80287/2015	V	.	.	.	N	R	.	.	D	.	K	.	.	G	D	.	.	.
B/Valparaiso/81181/2015	V	R	.	.	D	.	K	.	.	.	V	.	.	.
B/Santiago/80460/2015	V	.	.	.	N	R	.	.	D	N	K
B/Uruguay/98/2015	.	T	I	V	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/102/2015	.	T	I	V	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/289/2015	K	V	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/342/2015	V	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/345/2015	V	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/335/2015	V	R	.	.	D	.	K
B/Brazil/6297/2015	V	R	.	.	D	.	K
B/Santiago/69223/2014	V	R	.	.	D	.	K
B/Concepcion/264/2014	V	R	.	.	D	.	K
B/Brazil/2920/2014	V	R	.	.	D	.	K
B/Brazil/5137/2014	V	R	.	.	D	.	K
B/Uruguay/406/2014	F	V	R	.	.	D	N	K	
B/Uruguay/578/2014	F	V	R	.	.	D	N	K	
B/Paraguay/672/2014	V	S	.	.	D	N	K
B/Paraguay/4674/2014	P	V																	

Anexo 9. Sustituciones de aminoácidos en NA del linaje B/Yamagata

La cepa vacunal de referencia utilizada para el análisis se indica en negrita. Se utilizan cepas aisladas en Uruguay y seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. Con símbolo “.” se indican aquellas posiciones sin cambios y con símbolo “-” las posiciones para las cuales no se pudo determinar el aa.

	42	45	46	49	53	55	57	59	60	67	68	73	76	78	88	91	99	106	115	120	125	171	175	186	248	295	320	340	342	343	371	372	373	395	
B/Phuket/3073/2013	R	V	T	I	D	A	A	N	V	A	T	P	P	P	T	S	T	I	I	K	I	A	R	I	S	K	D	D	E	K	T	K	A		
A/EspiritoSanto/87/2019	.	.	.	M	M	K	Q	S
B/Santiago/64840/2019	.	.	.	M	M	K	Q	S
B/Santiago/63228/2019	.	.	.	M	M	K	Q	S
B/Argentina/13785/2018	.	.	.	M	M	K	.	.	N	Q	S	
B/Uruguay/1005/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	N	Q	S		
B/Uruguay/816/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	N	Q	S		
B/Uruguay/033/2018	.	.	.	M	M	K	.	R	.	Q	S		
B/Uruguay/727/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	.	Q	S		
B/Uruguay/1054/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	.	Q	S		
B/Uruguay/571/2018	.	.	.	M	M	.	.	K	.	.	.	K	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/553/2018	.	.	.	M	Q	M	.	.	K	.	.	.	K	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/1070/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	K	.	.	.	Q	.		
B/Brazil/7103/2018	.	.	.	M	M	K	.	.	.	Q	S		
B/Santiago/53060/2018	.	.	.	M	M	K	.	.	.	Q	.		
B/Argentina/14/2018	.	.	.	M	M	K	.	.	.	Q	.		
B/Santiago/34517/2018	.	.	.	M	M	K	.	.	.	Q	.		
B/Brazil/0379/2018	.	.	I	I	L	N	.	.	.	Q	.		
B/Paraguay/6288/2018	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Paraguay/0336/2018	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Santiago/75265/2017	.	.	.	M	M	K	.	.	.	Q	.		
B/Santiago/81374/2017	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Argentina/13252/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Paraguay/3099/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Paraguay/8072/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Argentina/1744/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/403/2017	A	V	M	N	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/113/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/119/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/338/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/106/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/126/2017	A	V	N	N	.	.	.	Q	.		
B/Uruguay/527/2017	A	V	N	.	.	.	Q	.		
B/Brazil/3889/2017	.	.	T	
B/Brazil/8134/2017	A	V	R	.	N	.	.	.	
B/Argentina/11616/2015	N	
B/Brazil/0589/2015	N	
B/Paraguay/0905/2015	N	
B/Santiago/75552/2015	Q	.	
B/Pucon/75541/2015	V	N	
B/Uruguay/372/2015	-	-	-	-	-	-	R	V	.	.	.	T	N	
B/Uruguay/309/2015	-	-	-	-	-	-	K	F	.	.	.	S	V	N	
B/Paraguay/6712/2015	M	
B/Brazil/36401/2015	N	D	
B/Paraguay/2429/2014	
B/SantaFe/1079/2014	Q	I	A	L	.	.	.	I	.	.	M	K	V	R	E	.	.	K	.	.	.	V		
B/SantaFe/1149/2014	
B/Uruguay/422/2014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
B/Uruguay/143/2014	.	.	N
B/Brazil/1716/2014
B/Brazil/2282/2014
B/Paraguay/0068/2014	.	I	L	K	.	.	E	N	.	K	
B/Santiago/71933/2014	
B/Santiago/73755/2014
B/Uruguay/252/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Uruguay/515/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	T	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Uruguay/153/2012	Q	I	.	.	T	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Uruguay/358/2012	Q	I	.	.	T	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Uruguay/266/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Uruguay/276/2012	-	-	-	-	-	-	K	N	.	A	L	.	L	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Uruguay/488/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Natal/119888/2012	.	I	L	E	N	.	K	
B/Tucuman/A285/2012	Q	I	.	.	T	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K		
B/BuenosAires/8833/2012	Q	I	.	.	T	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K		
B/Santiago/11896/2012	.	I	E	N	
B/Santiago/38204/2012	Q	I	A	L	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	K	V	R	E	.	.	K	
B/Santiago/15183/2010	.	I	.	.	.	S	.	.	.	L	E	N	.	K	
B/Uruguay/793/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	I	E	N	.	K	
B/Uruguay/1861/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	I	E	N	.	K	
B/Uruguay/218/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	I	.	.	.	T	E	N	.	K	
B/Uruguay/1050/2010	.	I	.	G	L	I</															

Anexo 10. Sitios de glicosilación en HA1 en linaje B/Victoria

Se indican cantidad de sitios encontrados para las cepas aisladas en Uruguay y las seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. La cepa vacunal de referencia se indica en negrita. Con el símbolo “x” se marcan los sitios posibles de glicosilación.

Cepas	# sitios	25	59	145	166	197	233	304	333
B/Brisbane/60/2008	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Colorado/06/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Washington/02/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/R158/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Florida/78/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Fujian/Gulou1272/2008	7	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Montana/05/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Singapore/19/2009	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/12/2008	7	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Malaysia/2506/2004	7	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Victoria/2/87	6	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Victoria/304/2006	7	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/211/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/159/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/1039/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/1301/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/517/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/581/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Antofagasta/15020/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/14887/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/3081/2010	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/9442/2011	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/2319/2011	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/14210/2011	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/14666/2011	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/0241/2011	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/190/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/252/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/257/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/311/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/312/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/236/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/34960/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/49303/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/0944/2012	7	x	x	x	x	x	x	x	x
B/BuenosAires/770/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Formosa/V2367/2012	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/177/2013	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/604/2013	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/3742/2013	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/82832/2013	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/PuertoMontt/81199/2013	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Concepcion/264/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/69223/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/2920/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/5137/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/154/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/BuenosAires/10986152/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/578/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/406/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/672/2014	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/4674/2014	7	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/98/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/102/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/335/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/345/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/384/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/289/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/864/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/94/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/105/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/396/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/11461/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Valparaiso/81181/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/80460/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/6297/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/80287/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/1131/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/5133/2015	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/02/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/789/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/34/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/2377/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/5894/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/268/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/0496/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Ceara/1449521EC/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/44313/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/45998/2016	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/124/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/137/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/138/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/140/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/511/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/379/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/383/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/659/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/700/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/830/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/2110/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/13339/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/4558/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/6128/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/25385/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/54067/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/8037/2017	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/13738/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/9/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/4835/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/2470/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/51375/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/34511/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/7301/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Paraguay/0620/2018	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/708/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/745/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/753/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/153/2019	6	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Bahia/735/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/SaoPaulo/1211465/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/48735/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/62161/2019	8	x	x	x	x	x	x	x	x

Anexo 11. Sitios de glicosilación en HA1 en linaje B/Yamagata

Se indican cantidad de sitios encontrados para las cepas aisladas en Uruguay y las seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. La cepa vacunal de referencia se indica en negrita. Con el símbolo “x” se marcan los sitios posibles de glicosilación.

Cepas	# sitios	11	25	59	145	167	196	232	303	332
B/Phuket/3073/2013_7gs	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Massachusetts/02/2012	6		x	x	x	x			x	x
B/Wisconsin/01/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Florida/4/2006	6		x	x	x	x			x	x
B/GuangdongLiwan/1133/2014	6		x	x	x	x			x	x
B/Yamagata/16/88	6		x	x	x			x		x
B/Brazil/6360/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/1000/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/1453/2010	6		x	x	x	x			x	x
B/Santiago/15183/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/1050/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/218/2010	6		x	x	x	x			x	x
B/Uruguay/793/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/1350/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/1861/2010	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/405/2011	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Natal/119888/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Tucuman/A285/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/BuenosAires/8833/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/11896/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/38204/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/153/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/358/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/252/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/266/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/276/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/488/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/515/2012	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/23499/2013	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/80686/2013	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/374/2013	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/325/2013	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/022/2013	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/0068/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/2429/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/1716/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/2282/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/SantaFe/1079/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/SantaFe/1149/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/143/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/422/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/71933/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/73755/2014	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/75552/2015	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/309/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/372/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Pucon/75541/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Argentina/11616/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/36401/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/0589/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/6712/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/0905/2015	7		x	x	x	x	x		x	x
B/RioGrandeDoNorte/140088/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Pernambuco/144718IEC/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Argentina/19/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Argentina/220/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/20269/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Valparaiso/49570/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/3296/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/5243/2016	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Argentina/1744/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Argentina/13252/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/106/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/113/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/119/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/126/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/403/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/527/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/338/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/1064/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/3889/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/8134/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/75265/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/81374/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/3099/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/8072/2017	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Argentina/13785/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Argentina/14/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Brazil/7103/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Brazil/0379/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Santiago/53060/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/34517/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/6288/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Paraguay/0336/2018	8		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/033/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/553/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/571/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/626/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/727/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/816/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/835/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Uruguay/1005/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/1054/2018	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Uruguay/1070/2018	7		x	x	x	x	x		x	x
B/Parana/27/2019	8		x	x	x	x	x	x	x	x
A/EspiritoSanto/87/2019	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/64840/2019	8		x	x	x	x	x	x	x	x
B/Santiago/63228/2019	8		x	x	x	x	x	x	x	x

Anexo 12. Sitios de glicosilación en NA del linaje B/Victoria

Se indican cantidad de sitios encontrados para las cepas aisladas en Uruguay y las seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. La cepa vacunal de referencia se indica en negrita. Con el símbolo “x” se marcan los sitios posibles de glicosilación.

Cepa	# sitios	56	64	144	284
B/Brisbane/60/2008	4	x	x	x	x
B/Colorado/06/2017	4	x	x	x	x
B/Washington/02/2019	4	x	x	x	x
B/Argentina/R158/2010	4	x	x	x	x
B/Florida/78/2015	4	x	x	x	x
B/Fujian/Gulou1272/2008	4	x	x	x	x
B/Montana/05/2012	4	x	x	x	x
B/Singapore/19/2009	4	x	x	x	x
B/Uruguay/12/2008	4	x	x	x	x
B/GuangdongLiwan/1133/2014	4	x	x	x	x
B/Victoria/2/87	4	x	x	x	x
B/Victoria/304/2006	4	x	x	x	x
B/Argentina/211/2010	4	x	x	x	x
B/Argentina/159/2010	4	x	x	x	x
B/Uruguay/1039/2010	4	x	x	x	x
B/Uruguay/517/2010	4	x	x	x	x
B/Uruguay/581/2010	4	x	x	x	x
B/Uruguay/1301/2010	3	x	x	x	x
B/Antofagasta/15020/2010	4	x	x	x	x
B/Santiago/14887/2010	4	x	x	x	x
B/Paraguay/3081/2010	4	x	x	x	x
B/Paraguay/0241/2011	4	x	x	x	x
B/Santiago/14210/2011	4	x	x	x	x
B/Santiago/14666/2011	4	x	x	x	x
B/Brazil/9442/2011	4	x	x	x	x
B/Brazil/2319/2011	4	x	x	x	x
B/Paraguay/190/2012	4	x	x	x	x
B/Paraguay/252/2012	4	x	x	x	x
B/BuenosAires/770/2012	4	x	x	x	x
B/Formosa/V2367/2012	4	x	x	x	x
B/Brazil/0944/2012	4	x	x	x	x
B/Santiago/34960/2012	4	x	x	x	x
B/Santiago/49303/2012	4	x	x	x	x
B/Uruguay/177/2013	4	x	x	x	x
B/Santiago/82832/2013	4	x	x	x	x
B/PuertoMontt/81199/2013	4	x	x	x	x
B/Brazil/6004/2013	4	x	x	x	x
B/Brazil/3742/2013	4	x	x	x	x
B/Concepcion/264/2014	4	x	x	x	x
B/Santiago/69223/2014	4	x	x	x	x
B/Argentina/154/2014	4	x	x	x	x
B/BuenosAires/10986152/2014	4	x	x	x	x
B/Brazil/2920/2014	4	x	x	x	x
B/Brazil/5137/2014	4	x	x	x	x
B/Paraguay/672/2014	4	x	x	x	x
B/Paraguay/4674/2014	4	x	x	x	x
B/Paraguay/1131/2015	4	x	x	x	x
B/Paraguay/5133/2015	4	x	x	x	x
B/Brazil/6297/2015	4	x	x	x	x
B/Brazil/80287/2015	4	x	x	x	x
B/Argentina/11461/2015	4	x	x	x	x
B/Uruguay/289/2015	3	x	x	x	x
B/Uruguay/342/2015	3	x	x	x	x
B/Uruguay/345/2015	3	x	x	x	x
B/Uruguay/335/2015	3	x	x	x	x
B/Uruguay/98/2015	4	x	x	x	x
B/Uruguay/102/2015	4	x	x	x	x
B/Valparaiso/81181/2015	4	x	x	x	x
B/Santiago/80460/2015	4	x	x	x	x
B/Paraguay/2377/2016	4	x	x	x	x
B/Paraguay/5894/2016	4	x	x	x	x
B/Santiago/44313/2016	4	x	x	x	x
B/Santiago/45998/2016	4	x	x	x	x
B/Uruguay/02/2016	4	x	x	x	x
B/Uruguay/789/2016	3	x	x	x	x
B/Brazil/0496/2016	4	x	x	x	x
B/Ceara/144952IEC/2016	4	x	x	x	x
B/Argentina/268/2016	4	x	x	x	x
B/Argentina/2110/2017	4	x	x	x	x
B/Argentina/13339/2017	4	x	x	x	x
B/Brazil/4558/2017	4	x	x	x	x
B/Brazil/6128/2017	4	x	x	x	x
B/Santiago/25385/2017	4	x	x	x	x
B/Santiago/54067/2017	4	x	x	x	x
B/Paraguay/8037/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/124/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/137/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/138/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/140/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/511/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/379/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/383/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/236/2012	3	x	x	x	x
B/Uruguay/406/2014	3	x	x	x	x
B/Uruguay/578/2014	3	x	x	x	x
B/Uruguay/830/2017	3	x	x	x	x
B/Uruguay/700/2017	3	x	x	x	x
B/Uruguay/673/2017	3	x	x	x	x
B/Paraguay/7301/2018	4	x	x	x	x
B/Paraguay/0620/2018	4	x	x	x	x
B/Brazil/4835/2018	4	x	x	x	x
B/Brazil/2470/2018	4	x	x	x	x
B/Santiago/51375/2018	4	x	x	x	x
B/Santiago/34511/2018	4	x	x	x	x
B/Argentina/13738/2018	4	x	x	x	x
B/Argentina/9/2018	4	x	x	x	x
B/Uruguay/708/2019	4	x	x	x	x
B/Uruguay/748/2019	4	x	x	x	x
B/Uruguay/753/2019	2	x	x	x	x
B/Bahia/735/2019	4	x	x	x	x
B/SaoPaulo/1211465IAL/2019	4	x	x	x	x
B/Santiago/48735/2019	4	x	x	x	x
B/Santiago/62161/2019	4	x	x	x	x

Anexo 13. Sitios de glicosilación en NA del linaje B/Yamagata

Se indican cantidad de sitios encontrados para las cepas aisladas en Uruguay y las seleccionadas de la región durante el año 2010 y en el período 2012 a 2019. La cepa vacunal de referencia se indica en negrita. Con el símbolo "x" se marcan los sitios posibles de glicosilación.

Cepa	# sitios	56	64	144	284
B/Phuket/3073/2013	4	x	x	x	x
B/Massachusetts/02/2012	4	x	x	x	x
B/Wisconsin/01/2010	4	x	x	x	x
B/Florida/4/2006	4	x	x	x	x
B/GuangdongLiwan/1133/2014	4	x	x	x	x
B/Yamagata/16/88	4	x	x	x	x
B/Brazil/6360/2010	4	x	x	x	x
B/Brazil/1000/2010	4	x	x	x	x
B/Santiago/15183/2010	4	x	x	x	x
B/Paraguay/1453/2010	4	x	x	x	x
B/Uruguay/1050/2010	4	x	x	x	x
B/Uruguay/218/2010	3	x	x	x	x
B/Uruguay/793/2010	3	x	x	x	x
B/Uruguay/1350/2010	3	x	x	x	x
B/Uruguay/1861/2010	3	x	x	x	x
B/Brazil/405/2011	4	x	x	x	x
B/Natal/119888/2012	4	x	x	x	x
B/Tucuman/A285/2012	4	x	x	x	x
B/BuenosAires/8833/2012	4	x	x	x	x
B/Santiago/11896/2012	4	x	x	x	x
B/Santiago/38204/2012	4	x	x	x	x
B/Uruguay/488/2012	3	x	x	x	x
B/Uruguay/153/2012	4	x	x	x	x
B/Uruguay/358/2012	4	x	x	x	x
B/Uruguay/252/2012	3	x	x	x	x
B/Uruguay/266/2012	3	x	x	x	x
B/Uruguay/276/2012	3	x	x	x	x
B/Uruguay/515/2012	3	x	x	x	x
B/Santiago/23499/2013	4	x	x	x	x
B/Santiago/80686/2013	4	x	x	x	x
B/Brazil/374/2013	4	x	x	x	x
B/Brazil/325/2013	4	x	x	x	x
B/Paraguay/022/2013	4	x	x	x	x
B/Uruguay/143/2014	4	x	x	x	x
B/Uruguay/422/2014	3	x	x	x	x
B/Paraguay/0068/2014	4	x	x	x	x
B/Paraguay/2429/2014	4	x	x	x	x
B/Brazil/1716/2014	4	x	x	x	x
B/Brazil/2282/2014	4	x	x	x	x
B/SantaFe/1079/2014	4	x	x	x	x
B/SantaFe/1149/2014	4	x	x	x	x
B/Santiago/71933/2014	4	x	x	x	x
B/Santiago/73755/2014	4	x	x	x	x
B/Uruguay/309/2015	3	x	x	x	x
B/Uruguay/372/2015	3	x	x	x	x
B/Santiago/75552/2015	4	x	x	x	x
B/Pucon/75541/2015	4	x	x	x	x
B/Argentina/11616/2015	4	x	x	x	x
B/Brazil/36401/2015	4	x	x	x	x
B/Brazil/0589/2015	4	x	x	x	x
B/Paraguay/6712/2015	4	x	x	x	x
B/Paraguay/0905/2015	4	x	x	x	x
B/Paraguay/3296/2016	4	x	x	x	x
B/Paraguay/5243/2016	4	x	x	x	x
B/RioGrandeDoNorte/140088/2016	4	x	x	x	x
B/Pernambuco/144718/EC/2016	4	x	x	x	x
B/Argentina/220/2016	4	x	x	x	x
B/Argentina/19/2016	4	x	x	x	x
B/Santiago/20269/2016	4	x	x	x	x
B/Valparaiso/49570/2016	4	x	x	x	x
B/Santiago/75265/2017	4	x	x	x	x
B/Santiago/81374/2017	4	x	x	x	x
B/Argentina/1744/2017	4	x	x	x	x
B/Argentina/13252/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/106/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/113/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/119/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/126/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/403/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/527/2017	4	x	x	x	x
B/Uruguay/338/2017	4	x	x	x	x
B/Brazil/3889/2017	4	x	x	x	x
B/Brazil/8134/2017	4	x	x	x	x
B/Paraguay/3099/2017	4	x	x	x	x
B/Paraguay/8072/2017	4	x	x	x	x
B/Paraguay/6288/2018	4	x	x	x	x
B/Paraguay/0336/2018	4	x	x	x	x
B/Brazil/7103/2018	4	x	x	x	x
B/Brazil/0379/2018	4	x	x	x	x
B/Argentina/13785/2018	4	x	x	x	x
B/Argentina/14/2018	4	x	x	x	x
B/Santiago/53060/2018	4	x	x	x	x
B/Santiago/34517/2018	4	x	x	x	x
B/Uruguay/033/2018	4	x	x	x	x
B/Uruguay/553/2018	4	x	x	x	x
B/Uruguay/571/2018	4	x	x	x	x
B/Uruguay/1054/2018	3	x	x	x	x
B/Uruguay/1005/2018	3	x	x	x	x
B/Uruguay/816/2018	3	x	x	x	x
B/Uruguay/727/2018	3	x	x	x	x
B/Uruguay/1070/2018	3	x	x	x	x
A/EspiritoSanto/87/2019	4	x	x	x	x
B/Santiago/64840/2019	4	x	x	x	x
B/Santiago/63228/2019	4	x	x	x	x