

PEDECIBA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**Variabilidad genética, evolución molecular y estacionalidad del Virus de Influenza
en el Ecuador**

Tesista: MSc. Alfredo Bruno C.

Orientador: Dra. Natalia Goñi

Centro Nacional de Referencia de Influenza, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, MSP. Uruguay

Co-orientador: Dr. Juan Cristina

Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay.

Lugar de ejecución: Centro Nacional de Influenza Ecuador / Universidad Agraria del Ecuador - Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay.

2024

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, mi Madre Eulalia Caicedo y hermano Mario Bruno por todo su cariño y respaldo de familia, mi esposa Doménica de Mora por su amor, apoyo incondicional en todo momento desde antes, durante todo el proceso de formación doctoral, a su señor Padre el Dr. Iván de Mora por sus sabios consejos.

Una dedicatoria especial a mi Padre Giulio Cessare Bruno Moggia, científico investigador quien formó mi carácter, principios, valores y me brindó la fuerza necesaria para enfrentar la vida en todas las circunstancias. En memoria de mi tío, el cual tengo el honor de llevar su nombre Alfredo Bruno Moggia, valiente Héroe y combatiente de la II Guerra Mundial.

A mis tutores, Natalia Goñi y Juan Cristina quienes admiro mucho como seres humanos y excelentes profesionales, sus experiencias y sabidurías han sabido guiarme de manera acertada para la elaboración de la presente tesis. Agradezco a la Red Global de Vigilancia y Respuesta de la Influenza de la OMS (GISRS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EEUU (CDC), plataforma GISAID, MSP, INSPI y a la Universidad Agraria del Ecuador por la contribución logística, científico – técnica.

Cum luce salutem,

En memoria de mi Padre.

RESPONSABILIDAD

La responsabilidad, derecho de la investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones que aparecen en el presente Trabajo de Titulación corresponden exclusivamente al Autor y los derechos académicos otorgados al programa PEDECIBA de la Universidad de la Republica del Uruguay.

MVZ. Alfredo Bruno Caicedo

C. I. 0919289850

INDICE GENERAL

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. FUNDAMENTACIÓN Y ANTECEDENTES	14
1.1. Introducción	14
1.2. Historia	18
1.3. Influenza aviar	21
1.4. Proceso de selección vacunal	22
2. ESTRUCTURA DEL VIRUS, ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REPLICACION VIRAL	27
2.1. Replicación viral	29
2.2. Datos genéticos y evolutivos del virus de Influenza en América y el mundo 2015 – 2023.	34
2.2.1. Influenza A/H1N1 pdm09	34
2.2.2. Influenza A /H3N2	38
2.2.3.- Virus de la influenza B	42
2.2.4. Influenza H5N1	48
2.2.5. Importancia de la problemática a abordar	51
3. OBJETIVOS	55
3.1. Objetivo General	55
3.2. Objetivos Específicos	55
4. MATERIALES Y METODOS:	56
4.1. Diseño:	56
4.2. Universo:	56
4.3. Extracción de ARN:	56
4.4. Amplificación Molecular para los virus de Influenza:	56
4.5. Secuenciación:	57
4.6. Visión espacial, temporal y evolutiva del virus de Influenza en Ecuador.	57
4.6.1. Análisis de Secuencias.	59
4.7. Análisis Filogenético de Influenza aviar H5N1.	61
5. RESULTADOS	63
5.1. Análisis de temporalidad Influenza en Ecuador	63
5.1.1. Temporalidad de Influenza A/H1N1 pdm09 y A/H3N2	63

5.1.2. Temporalidad de Influenza B.	75
5.2. Análisis de variabilidad genética y evolución molecular de Influenza estacional.	81
5.4. Relación genética de cepas vacunales y secuencias de Influenza circulantes en Ecuador.	95
5.4. Presencia del marcador H275Y	93
5.5. Análisis filogenético del brote de Influenza aviar H5N1 en aves de corral en Ecuador en noviembre 2022.	102
6. DISCUSION	104
7. CONCLUSIONES	111
8. REFERENCIAS	116
9. ANEXOS	134

INDICE FIGURAS

Figura 1. Caracterización morfológica ultra estructural del virus de Influenza..	16
Figura 2. Ubicación geográfica del Ecuador..	18
Figura 3. Reunión de composición de la vacuna de Influenza y su período de disponibilidad según formulación del Hemisferio Norte y Sur.	24
Figura 4. Zonas de vacunación de Influenza y formulación de vacuna recomendada por la OMS para zonas del trópico y subtropical.	25
Figura 5. Zonas de vacunación de Influenza y formulación de vacuna aplicadas por los países tropicales y subtropicales.	25
Figura 6. Representación esquemática de la estructura del virus de Influenza..	27
Figura 7. Unión del virus de Influenza a células del tracto respiratorio.	29
Figura 8. Ciclo de replicación del virus de Influenza.	33
Figura 9. Filogenia de la hemaglutinina del virus de Influenza A/H1N1 pdm0935	
Figura 10. Filogenia de la hemaglutinina del virus de Influenza A/H3N2	39
Figura 11. Árbol Filogenético de la región de la HA de los virus de Influenza B	43
Figura 12. Emergencia y evolución de la gripe aviar H5N1.	49
Figura 13. Mapa de las provincias analizadas en el estudio de temporalidad.	61
Figura 14. Estacionalidad de Influenza A en Ecuador 2011-2021.	63
Figura 15. Momento de los picos primarios y secundarios mensuales de Influenza A en seis provincias ecuatorianas diferentes	64
Figura 16. Parámetros climáticos de las provincias ecuatorianas.	66
Figura 17. Estacionalidad de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador; 2012 - 2022.	67
Figura 18. Estacionalidad mensual de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador; 2012 - 2022.	68
Figura 19. Análisis de pico epidémico primario de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador	69
Figura 20. Análisis de pico epidémico secundario de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador; 2012 - 2022.	70

Figura 21. Estacionalidad de Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022.....	71
Figura 22. Estacionalidad mensual de Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022.....	72
Figura 23. Análisis de pico epidémico primario, Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 – 2022.....	73
Figura 24. El Análisis de pico epidémico secundario, Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022.....	74
Figura 25. Estacionalidad de Influenza B en Ecuador; enero 2012 - junio 2023.	76
Figura 26. Estacionalidad de Influenza B por mes en Ecuador; enero 2012 - junio 2023.	77
Figura 27. Análisis de pico epidémico primario, Influenza B en Ecuador; enero 2012 - junio 2023.	78
Figura 28. Análisis de pico epidémico secundario, Influenza B en Ecuador; enero 2012 - junio 2023.	79
Figura 29. Análisis del árbol filogenético bayesiano MCMC de las cepas de Influenza estacional que circulan en Ecuador.	85
Figura 30. Filogenia del virus de Influenza tipo B en Ecuador 2015-2023. . . .	86
Figura 31. Análisis filogenético de los virus de Influenza A/H1N1 pdm09 Ecuador 2013 - 2020.....	87
Figura 32. Análisis filogenético de los virus de Influenza A/H3N2, Ecuador 2015 - 2022.....	88
Figura 33. Análisis filogenético de los virus de Influenza B/Victoria, Ecuador 2016 - 2023.....	89
Figura 34. Análisis filogenético de los virus de Influenza B/Yamagata, Ecuador 2015 - 2019.....	90
Figura 35. Evolución molecular y abundancia relativa de clados/subclados Distribución de clados/subclados por año del subtipo A/H1N1 pdm09, Ecuador 2015 - 2020.....	91
Figura 36. Evolución molecular y abundancia relativa de clados/subclados Distribución de clados/subclados por año del subtipo A/H3N2, Ecuador 2015 - 2023.....	92
Figura 37. Evolución molecular y abundancia relativa de clados/subclados por año de Influenza B, Ecuador 2015 - 2023.	93

Figura 38. Alineamiento de aminoácidos de la región de la neuraminidasa entre secuencias vacunales y secuencias aisladas en Ecuador 2015-2020.....	94
Figura 39. Modelaje de sustitución H275Y de secuencia de A/H1N1 pdm09 Ecuador en una estructura 3D de la proteína NA.	95
Figura 40. Filogenia del clado 2.3.4.4b del HPAIV A(H5N1) en las Américas en 2021-2023.	103

INDICE TABLAS

Tabla 1. Resumen de cambio de aminoácidos con efecto en el sitio de glicosilación.....	47
Tabla 2. Parámetros de series de tiempo encontrados en los estudios de estacionalidad de Influenza A en Ecuador.	65
Tabla 3. Análisis de pico epidémico primario y secundario, subtipos de Influenza A/H1N1 pdm09 y A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022.	75
Tabla 4. Estacionalidad de Influenza A y B en Ecuador. Análisis de pico primario y secundario por provincias.	80
Tabla 5. Positividad anual de los virus de Influenza, Ecuador 2015 - 2023....	80
Tabla 6. Inferencia coalescente bayesiana Influenza A reportadas en Ecuador.	82
Tabla 7. Relación genética y antigénica de la frecuencia de clados circulantes de Influenza en Ecuador 2015 – 2023, con respecto a la formulación anual de la vacuna recomendada por la OMS	97
Tabla 8. Análisis de concordancia de la formulación de la vacuna de Influenza B recomendada para el Hemisferio Norte y los linajes circulantes identificados Ecuador 2015 – 2023.....	101

INDICE ANEXOS

Anexo 1. Secuencias genéticas de Ecuador utilizadas en el análisis de coalescencia de Ecuador.	134
Anexo 2. Secuencias de Influenza B de Ecuador de la región Hemaglutinina.	137
Anexo 3. Script para la elaboración de gráficos muller plot en R.	138
Anexo 4. Secuencias de Influenza aviar H5N1 identificadas en Ecuador.	138
Anexo 5. Cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias analizadas del 2013 a 2020 en la región HA del subtipo A/H1N1 pdm09 con respecto a la cepa vacunal A/Victoria/4897/2022.	139
Anexo 6. Cambios a nivel de sitios de glicosilación entre las secuencias analizadas de la región HA del subtipo A/H1N1 pdm09 con respecto a la cepa vacunal A/Victoria/4897/2022.....	140
Anexo 7. Cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias analizadas de la región HA del subtipo A/H3 con respecto a la cepa vacunal A/Darwin/9/2021.	141
Anexo 8. Diferencia entre sitios de glicosilación de la cepa vacunal 2023 y clados región HA del subtipo A/H3 Ecuador.....	142
Anexo 9. Cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias de Influenza B/Victoria analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Austria/1359417/2021..	143
Anexo 10. Diferencia entre los sitios de glicosilación entre las secuencias de Influenza B/Victoria analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Austria/1359417/2021.....	144
Anexo 11. Cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias de Influenza B/Yamagata analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Phuket/3073/2013	145
Anexo 12. Cambios a nivel de sitios de glicosilación entre las secuencias de Influenza B/Yamagata analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Phuket/3073/2013.....	146
Anexo 13. Análisis de mutaciones de aminoácidos A/H5N1	147
Anexo 14. Spatial, temporal and evolutionary insight into seasonal epidemic Influenza A virus strains near the equatorial line: The case of Ecuador.....	149

Anexo 15. Phylogenetic analysis reveals that the H5N1 avian influenza A outbreak in poultry in Ecuador in November 2022 is associated with the highly pathogenic clade 2.3.4.4b.156

RESUMEN

La influenza es una enfermedad respiratoria que infecta anualmente entre el 5-15% de la población mundial y es ocasionada por el virus Influenza perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, se divide en los tipos A, B, C y D. Una de las principales estrategias de prevención es la vacunación, sin embargo, la formulación de las vacunas se basa en la información obtenida a partir de países del hemisferio norte y sur, donde reside el 57 % y 2 % de la población mundial, respectivamente, lo cual, representa un desafío debido a una relativa escasez de datos procedentes de países tropicales, donde habita el 41 % de la población. Ecuador es un país tropical ubicado en la línea ecuatorial; el objetivo del estudio es determinar la variabilidad genética, evolución molecular y estacionalidad de Influenza en Ecuador, para lo cual, se analizaron series temporales epidemiológicas mediante la herramienta EPIPOI, a partir de datos publicados en la plataforma *Flunet*. Para análisis filogenéticos, se utilizaron secuencias obtenidas de la plataforma GISAID y herramientas bioinformáticas como MAFFT, BEAST, MEGA. Los resultados obtenidos evidencian que la epidemiología de Influenza en Ecuador, se asemeja a países del hemisferio norte y sugieren que la formulación de la vacuna del hemisferio norte es más apropiada para este país. Los virus de Influenza A presentan mayor variabilidad genética que el tipo B. El subtipo A/H3N2, evidenció mayor diversidad genética y los virus con menor variabilidad fueron los B/Yamagata. Entre todas las muestras analizadas, se identificó una muestra del subtipo A/H1N1 pdm09 con la mutación H275Y. Se evidenció la co-circulación de diferentes linajes genéticos de influenza en diferentes regiones geográficas del país. El brote de Influenza aviar causante de la emergencia zoonosaria en el país fue originado por el clado 2.3.4.4b, el cual, ha ocasionado casos de transmisión accidental animal – hombre y presenta un riesgo constante para la salud pública y la economía de los países de la región.

ABSTRACT

Influenza is a respiratory disease that infects 5 – 15 % of the world's population annually. Influenza virus belongs to the *Orthomyxoviridae* family and is classified into types A, B, C, and D. Vaccination is one of the main prevention strategies, but vaccine formulations are based on information from countries in the northern and southern hemisphere, where 57 % and 2 % of the world's population reside, respectively. This is a challenging due to the relative scarcity of data from tropical countries, where 41 % of the world's population lives. Ecuador is a tropical country located on the equator line and the aim of this study was to determine the genetic variability, molecular evolution and seasonality of Influenza in Ecuador. Epidemiological time series were analyzed using the EPIPOI tool based on data published on the Flunet platform. Phylogenetic analyses were performed using sequences obtained from GISAID platform and bioinformatics tools such as MAFFT, BEAST, and MEGA. The results show the influenza epidemiology in Ecuador is similar to that of countries in the northern and suggest that the northern hemisphere vaccine formulation is more appropriate for this country. Influenza A viruses exhibit greater genetic variability than type B. The A/H3N2 subtype showed the greatest genetic diversity, while B/Yamagata viruses had the least variability. Among all samples analyzed, one A/H1N1 pdm 09 subtype sequence with the H275Y mutation was identified. Co-circulation of different genetic lineages of influenza was observed in different geographical regions of the country. The avian influenza outbreak that caused zoonotic emergency in the country was caused by clade 2.3.4.4b, which has caused cases of accidental animal-to-human transmission and poses a constant risk to public health and the economy of countries in the region.

1. FUNDAMENTACIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Introducción

La influenza o gripe es una enfermedad respiratoria aguda muy contagiosa que infecta anualmente entre el 5-15% de la población mundial. Los brotes suelen aparecer durante los meses más fríos del año, debido a la baja temperatura y la humedad del invierno. Estos cambios climáticos incrementan la susceptibilidad del epitelio respiratorio a la infección y, al mismo tiempo, favorecen la supervivencia del virus en las secreciones respiratorias eliminadas. Además, otros factores como la virulencia, antigenicidad viral, factores del huésped, inmunidad del huésped, contribuyen al aumento de la transmisión del virus de persona a persona. La transmisión se realiza principalmente a través de las microgotas y secreciones respiratorias en espacios cerrados (1).

Las epidemias de influenza pueden empezar desde brotes originados en escuelas y distribuirse en toda la población. Los niños desempeñan un papel crucial en la diseminación del virus dentro de las comunidades y hogares. Esto se debe a que llevan el agente a sus hogares, contagian a sus padres, quienes a su vez dispersan la infección en los lugares de trabajo. Este ciclo resulta en la multiplicación de personas infectadas (2,3).

El aumento en la tasa de hospitalización y fallecimientos afecta principalmente a dos grupos etarios: los menores de dos años y los mayores de 65 años. Además, las mujeres embarazadas y los individuos con enfermedades crónicas subyacentes también se ven significativamente afectados. Es importante mencionar que, aunque estos grupos son los más afectados, la enfermedad puede presentarse en personas de cualquier edad (4).

Las personas que se consideran dentro de los grupos de riesgo son motivo de gran preocupación tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Esta situación se atribuye a la vulnerabilidad de ciertos individuos en términos de susceptibilidad al contagio y la gravedad del cuadro clínico que podrían desarrollar. Las complicaciones pueden surgir dependiendo de la edad del paciente, así como de las comorbilidades existentes (2).

Los niños menores de 2 años pueden experimentar laringotraqueobronquitis, una afección que se caracteriza por laringitis con tos seca y dificultad respiratoria. Esta condición puede complicarse con una neumonía bacteriana secundaria. Por otro lado, los ancianos son propensos a desarrollar neumonías fatales debido a sobreinfecciones bacterianas. Estas sobreinfecciones son causadas principalmente por bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenzae*. Además, en estos individuos, las enfermedades crónicas preexistentes, como la insuficiencia cardíaca congestiva, pueden exacerbarse (5).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las epidemias anuales de gripe estacional causan entre 3 y 5 millones de casos de enfermedad grave y de 291.243 a 465.832 (4.0 a 8.8 por 100.000) individuos mueren anualmente. Se estima que en los Estados Unidos se enferman anualmente dos tercios de la población, de ellos, el 50 % requiere atención médica y alrededor de 36.000 pacientes mueren (6).

El Virus de Influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Contiene ocho segmentos de una simple cadena de ARN con polaridad negativa y se clasifica en los tipos A, B, C y D. Los tipos A y B pueden presentarse anualmente y son la causa de grandes pandemias, epidemias y brotes. El tipo C provoca una infección leve sin gran repercusión en salud pública. Por otro lado, el tipo D afecta principalmente al ganado y no se ha identificado hasta el momento en seres humanos (7 - 10).

Las cepas de Influenza A, cuentan con una mayor variabilidad genética debido a su alta tasa de mutación y a la capacidad de reordenarse entre diferentes especies. Se dividen en subtipos según dos glicoproteínas de superficie del virus: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Estas glicoproteínas pueden apreciarse en la caracterización morfológica ultraestructural de la Figura 1, como proyecciones que emergen a partir de una partícula viral de 100 nm. Hasta la fecha, se han identificado 18 subtipos diferentes de hemaglutinina y 11 subtipos diferentes de neuraminidasa (11, 12).

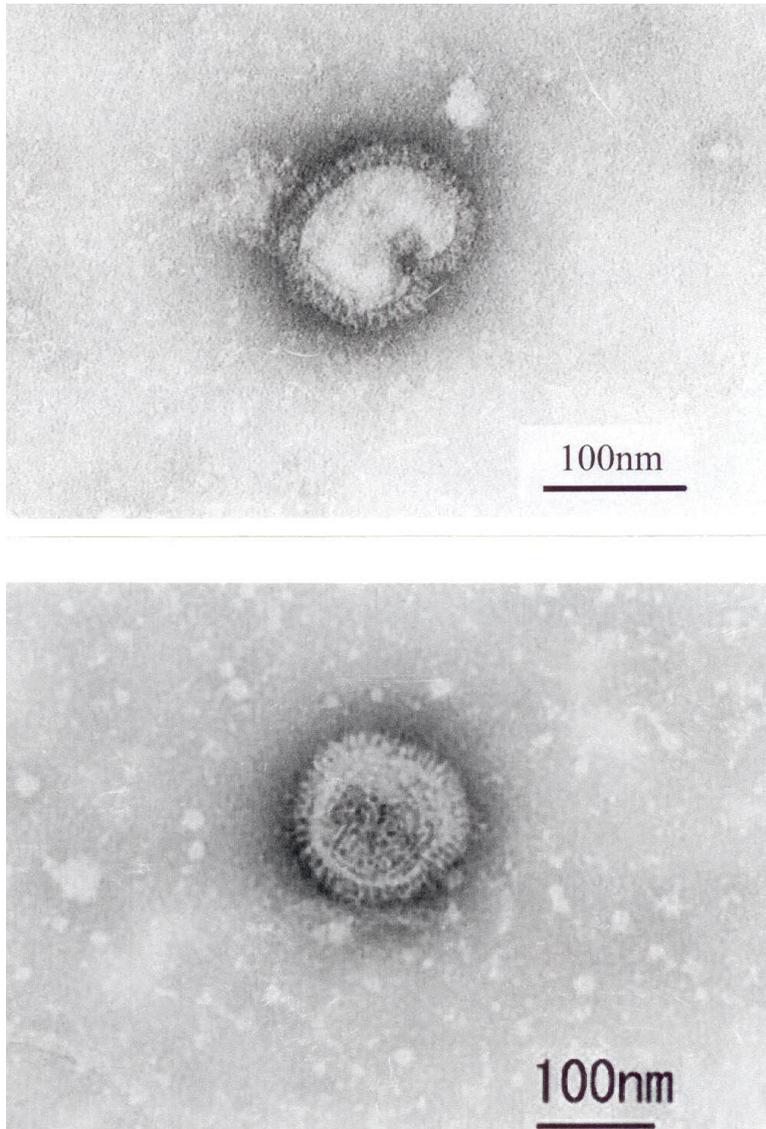


Figura 1. Caracterización morfológica ultra estructural del virus de Influenza. (13). Micrografía electrónica de transmisión del virus de la Influenza A. La imagen, tomada a una escala de 100 nm, muestra la morfología del virión, incluyendo las dos glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina y la neuraminidasa. La hemaglutinina, que se utiliza por el virus para unirse a la célula huésped, se puede observar como proyecciones en forma de espiga en la superficie del virión. La neuraminidasa, que juega un papel crucial en la liberación de nuevos viriones en la replicación también es visible.

La característica principal del virus es la capacidad de sufrir variaciones antigénicas. Estas variaciones pueden ser de dos tipos: la deriva antigénica, que es un proceso gradual y continuo que ocurre en las proteínas víricas hemaglutinina o neuraminidasa, y los cambios antigénicos mayores, que pueden dar origen a nuevos subtipos por reordenamiento o salto interespecie (8).

Estos cambios antigénicos mayores son responsables de pandemias con graves consecuencias. Un ejemplo de esto es la pandemia ocurrida en 1918, cuando el virus de influenza A/H1N1 causó más de 40 millones de muertes humanas. De manera similar, la gripe asiática de 1957 y la de Hong Kong en 1968 ocasionaron, cada una, alrededor de 4 millones de fallecidos (10).

Además de las pandemias que afectan a los humanos, la influenza tiene la capacidad de infectar animales, lo que ha llevado a la aparición de epizootias de influenza aviar en varios países. Estos eventos han resultado en el contagio de casos humanos que estuvieron expuestos a las aves enfermas, lo que ha generado alerta en la OMS (11).

En respuesta a este constante riesgo, durante la 58ª Asamblea Mundial de la Salud en 2005, la OMS adoptó la resolución “Fortalecimiento de la preparación y respuesta ante una influenza pandémica”. Esta resolución insta a los estados miembros a intensificar y coordinar sus esfuerzos en la vigilancia epidemiológica de la influenza. El objetivo es minimizar los potenciales peligros de un posible salto antigénico de un virus pandémico, el cual podría originar una cepa mucho más agresiva y virulenta (11).

En Ecuador (ver ubicación geográfica en Figura 2), se han descrito dos picos anuales de circulación del virus influenza entre los meses de enero y agosto. Esto hace necesario la constante investigación de los virus circulantes, así como su evolución molecular, con el fin de comprender mejor su comportamiento en el país y su nivel de similitud con las cepas de referencia utilizadas en las formulaciones anuales de vacunas recomendadas para la región. De esta manera, se permite a las autoridades nacionales de salud tomar decisiones basadas en información científica sustentable (14 - 16).

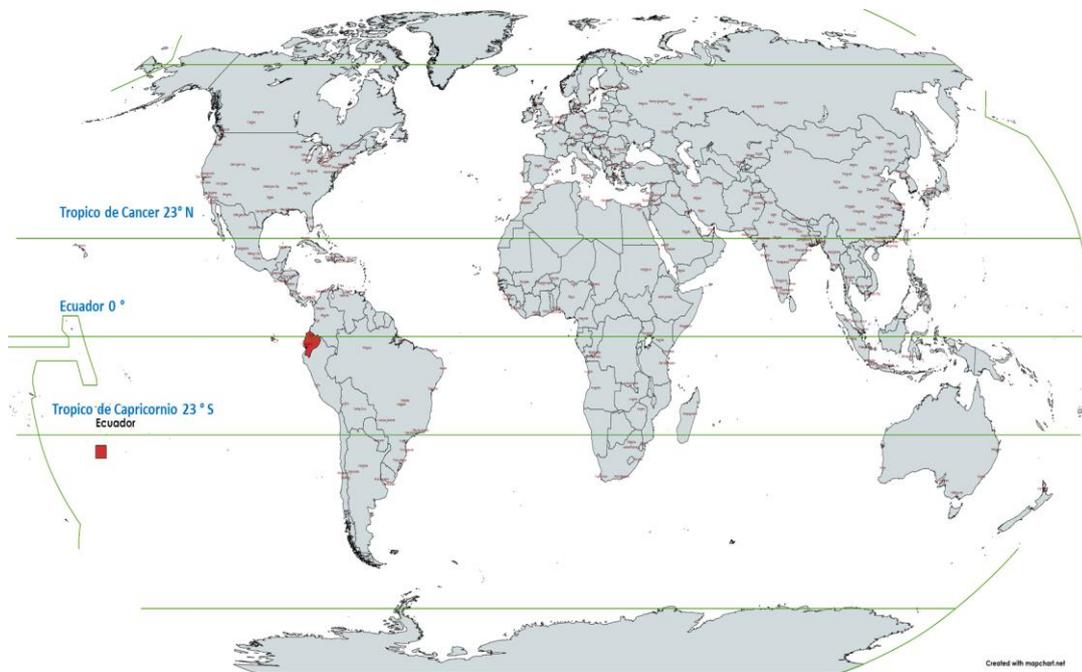


Figura 2. Ubicación geográfica del Ecuador. Esta figura muestra la ubicación del Ecuador destacada en color rojo, situada entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio. El mapa fue elaborado mediante la herramienta mapchart.net <https://www.mapchart.net/americas-detailed.html> (17).

1.2. Historia

La influenza, una enfermedad respiratoria altamente contagiosa, ha provocado epidemias de variable severidad durante siglos. Un informe de Hipócrates describe un brote en el 412 a.C. que probablemente fue causado por el virus de Influenza, aunque no se pudo confirmar debido a la falta de información científica sustentable. El término “influenza” fue derivado del italiano “influentia” a mediados del siglo XIV, cuando se pensaba que esta enfermedad era resultado de influencias astrológicas. El primer reporte sobre una pandemia de influenza data del año 1580, comenzando en Asia y extendiéndose por África, Europa y finalmente, América. Entre 1889-1890, se introdujo la gripe rusa, causada por el subtipo A/H3N8 (18).

Sin embargo, la humanidad no había vivido pandemia más mortífera como la gripe “Española” (A/H1N1). Esta se presentó al final de la Primera Guerra

Mundial en 1918 y causó un mayor número de defunciones que la misma guerra entre 1914 y 1918, con aproximadamente 40 millones de personas fallecidas (19).

En el siglo XIX, la afección conocida por influenza, se pensaba que era debido a una infección bacteriana producida por el *Haemophilus influenzae*. En el año 1931 Richard Shope postuló que el agente causal sería, probablemente, un virus (18).

Después de pocos años, en 1933, Smith y colaboradores aislaron el virus de Influenza A de los humanos con enfermedad respiratoria. En 1939 Francis logró recuperar el virus tipo B (20).

Por otra parte, Hirst en 1941 descubrió el fenómeno de la hemoaglutinación que dio lugar a un método simple, económico para cuantificar el virus y los anticuerpos específicos. Posteriormente, en el año de 1950, Taylor, aisló el tipo de Influenza C (20).

En el año de 1957 la gripe “Asiática” se originó en la provincia Yunan de China, causada por el subtipo A/H2N2 de procedencia aviar. Se dispersó rápidamente hacia el sureste de Asia, Japón, Indonesia, India, Australia, y luego se extendió a Europa, África y América. Finalmente, después de 6 meses, se propagó por todo el mundo, superando el millón de muertos. En julio de 1968, otra cepa de gripe, causada por el subtipo A/H3N2, se originó en China. Llegó a Hong Kong después de dos semanas, causando 500.000 muertes y un ausentismo escolar que estuvo estimado en un 50 % (21).

La última pandemia de influenza, que inició en marzo de 2009, fue resultado de sucesivos reordenamientos de segmentos de ARN del virus de Influenza de origen porcino, aviar y humanos, presentes desde inclusive el siglo pasado. En resumen, diversos análisis evolutivos demostraron que esta cepa surgió a partir de los siguientes reordenamientos: en Europa, en 1979, un virus aviar A/H1N1 se introdujo en cerdos. Con el paso de los años, fue gradualmente remplazado por la cepa clásica porcina A/H1N1, que produjo la cepa “*Avian-like swine*” H1N1. Esta cepa tuvo un posterior reordenamiento con el virus de la Influenza estacional humana A/H3N2 (21).

Previamente en América del Norte, durante 1998, circuló un virus con triple reordenamiento de A/H3N2, una combinación de genes de influenza porcina A/H1N1 clásico, la influenza aviar y la estacional humana A/H3N2. Esta nueva cepa se estableció en la población de cerdos y posteriormente se combinó con las cepas porcinas A/H1N1 y A/H1N2, dando lugar al triple reordenamiento porcino que desde 2005, ha causado infecciones esporádicas en humanos (22).

Por otra parte, en Asia, todas las cepas mencionadas anteriormente estaban circulando, lo que provocó la formación de la nueva variante. Se puede concluir que las tres regiones componentes de la polimerasa (PB1, PB2 y PA) junto con las proteínas: hemaglutinina, nucleoproteína y la proteína no estructural (HA, NP y NS) emergieron del triple reordenamiento porcino. Las proteínas de la matriz y de la neuraminidasa (M y NA) provienen directamente del linaje "*Eurasian-avian like swine*" H1N1. Todas estas regiones tuvieron un reordenamiento genético, dando como resultado la formación de la nueva cepa A/H1N1pdm09 (23).

El 21 de abril del año 2009, este nuevo virus de Influenza A de origen porcino, fue reportado en Estados Unidos y dos días después en México. Durante las primeras semanas el virus se expandió por 30 países con una transmisión interhumana, lo que provocó que la OMS subiera el nivel de alerta de 5 a 6, el día 11 de junio del mismo año, convirtiéndose en la primera pandemia del siglo XXI (24).

Según informes técnicos del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical "Leopoldo Izquieta Pérez", en Ecuador, este virus se identificó por primera vez, en la ciudad de Guayaquil el día 15 de mayo del 2009. La muestra provenía de un paciente con antecedentes de viaje a la ciudad de Miami. Después de unas pocas semanas, a partir de contactos primarios, secundarios y casos nuevos que se introdujeron en el país, este virus se diseminó por la mayor parte de la geografía ecuatoriana (13).

En cuestión de semanas, la infección se convirtió en una emergencia de salud pública, lo que llevó al cierre de escuelas, colegios, universidades y otros lugares con grandes conglomerados de personas. Este evento causó alarma

en la población. Ante esta situación, el Ministerio de Salud Pública (MSP) tomó medidas de prevención y control de manera oportuna para mitigar el impacto de la enfermedad. Una de las estrategias de prevención más efectivas que se implementó fue la vacunación de grupos prioritarios (13).

1.3. Influenza aviar

Después de haber discutido la influenza en humanos y su impacto en la salud pública, es importante mencionar que los virus de la influenza no tienen como huésped exclusivamente al humano. De hecho, también existen variantes que están muy bien adaptadas en otras especies, como las aves.

El virus de Influenza aviar, también conocido como gripe aviar, es una enfermedad infecciosa causada por variantes del virus de la Influenza A que están adaptadas a los receptores celulares de las aves. Estos virus pueden propagarse entre aves acuáticas salvajes en todo el mundo y pueden infectar a las aves de corral y otras especies de aves y animales incluido mamíferos. Algunas cepas de influenza aviar, como la influenza aviar altamente patógena (HPAIV, por sus siglas en inglés), originan enfermedades graves y a menudo mortales en aves. Por lo tanto, representan un gran riesgo para la salud humana y animal (25).

Los virus de influenza aviar tienen el potencial de causar pandemias cuando adquieren la capacidad de transmitirse con facilidad de persona a persona, y la población humana tiene poca o ninguna inmunidad contra el virus. Debido a la globalización, viajes, y otros determinantes de la salud, la pandemia puede propagarse rápidamente (26).

Aunque es desconocido si los virus de influenza aviar, porcina y otros que circulan actualmente resultarán en una futura pandemia, la diversidad de los virus de influenza zoonótica que han causado infecciones humanas y a otros mamíferos requieren una vigilancia reforzada en poblaciones de animales y humano. Además, es mandatorio realizar una investigación exhaustiva de cada infección zoonótica y planificar la preparación para una pandemia (26).

Como se ha podido observar a través de la historia, a medida que aumentan los brotes en animales, también puede aumentar el riesgo de propagación a las

personas. Las oportunidades para el reordenamiento entre los virus de influenza circulantes entre animales y humanos representan una constante amenaza para la emergencia de un nuevo virus con potencial pandémico-epidémico (27, 28).

1.4. Proceso de selección vacunal

La influenza conduce a una alta morbilidad y mortalidad en las Américas, un impacto que puede ser mitigado mediante una campaña de vacunación antigripal bien seleccionada y programada. Dada la evolución constante de los virus de Influenza, es esencial que los países proporcionen datos de vigilancia de alta calidad y en tiempo real. La integración y fortalecimiento de los sistemas de vigilancia genómica, realizados de manera sistemática y rutinaria permiten el seguimiento de las secuencias genéticas de virus circulantes. Esta información es crucial para la toma de decisiones en salud pública sobre las estrategias de prevención, mitigación y selección de la formulación de la vacuna de Influenza más apropiada (29).

La vacunación es la mejor forma de prevenir la influenza y atenuar las consecuencias de la enfermedad. Los datos de los CDC desde el 4 de octubre de 2021 hasta el 30 de abril del 2022, mostraron que las vacunas contra Influenza redujeron el riesgo de personas de contraer una enfermedad grave ocasionada por el subtipo H3N2 y los otros tipos más comunes de esa temporada, en un 35% en general (30).

La selección de componentes para la vacuna de influenza se realiza en diferentes momentos para cada hemisferio. Para el hemisferio norte, la selección ocurre durante el mes de febrero, mientras que, para el hemisferio sur, la selección se realiza en septiembre. Durante estos períodos, los expertos la OMS y los países miembros examinan los datos de vigilancia y determinan que cepas se anticipan a la siguiente temporada. Por lo general, las vacunas del hemisferio norte se encuentran disponibles en los países entre los meses de octubre y noviembre. Por otro lado, las vacunas del hemisferio sur están disponibles entre finales de marzo y principios de abril (31).

Este proceso de selección y distribución de las vacunas es posible gracias a la colaboración global en la vigilancia de influenza. La Red Global de Vigilancia de Influenza está conformada por 143 laboratorios reconocidos por la OMS como Centros Nacionales de Influenza (NIC), 6 Centros Colaboradores de la OMS (CC de la OMS), 4 Laboratorios Reguladores Esenciales de la OMS y 13 laboratorios de referencia de la OMS (32).

Los laboratorios colaboradores de la red global monitorean la evolución de los virus de la Influenza estacional, hacen seguimiento del comportamiento virológico o evalúan el potencial pandémico de los nuevos virus gripales con la finalidad de recomendar medidas de prevención, formulaciones anuales de las vacunas, la cual es la forma más eficaz de prevenir la gripe y atenuar las consecuencias de la enfermedad (32).

Con el objeto de decidir la versión más apropiada de cepas, la OMS organiza dos veces al año, la reunión con el comité de expertos internacionales. Este comité está conformado por representantes de los principales laboratorios nacionales, laboratorios esenciales de regulación y academias. De manera colaborativa y bajo el marco de la red global se analizan las características moleculares, serológicas, epidemiológicas con la finalidad de elaborar las recomendaciones sobre la siguiente composición de la vacuna contra la influenza. En la Figura 3, se pueden observar los períodos de disponibilidad de las vacunas para el hemisferio norte y para el hemisferio sur. (33 - 35).

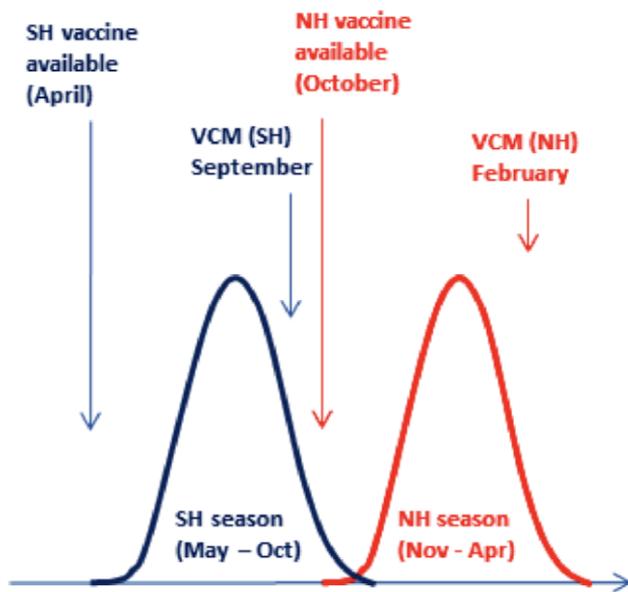
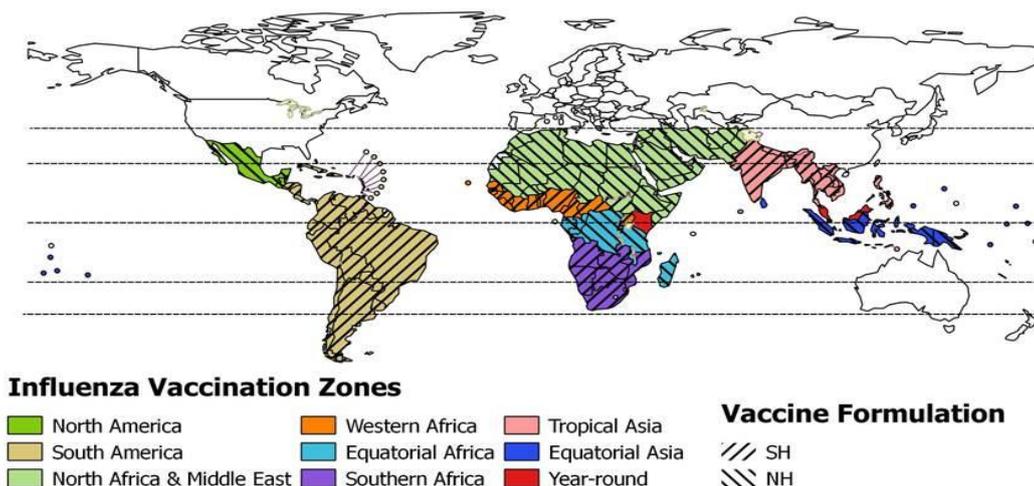


Figura 3. Reunión de composición de la vacuna de Influenza y sus períodos de disponibilidad según la formulación del Hemisferio Norte y Sur. (36). SH: hemisferio sur por sus siglas en inglés; VCM: reunión de la composición de la vacuna; NH: hemisferio norte, el color azul oscuro representa la información correspondiente al hemisferio sur y de color rojo lo que respecta al hemisferio norte.

En la Figura 4 y 5 se puede ilustrar las zonas de vacunación recomendadas por la OMS y las formulaciones aplicadas en cada uno de los países, respectivamente.

Influenza vaccine formulation



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

© WHO 2016. All rights reserved.



Figura 4. Zonas de vacunación de Influenza y formulación de la vacuna recomendada por la OMS para zonas del trópico y subtropical (36). Los colores representan cada una de las zonas geográficas de los continentes y las líneas diagonales con dirección hacia abajo representa la formulación del hemisferio sur; las líneas diagonales con dirección hacia arriba representa la formulación del hemisferio norte.

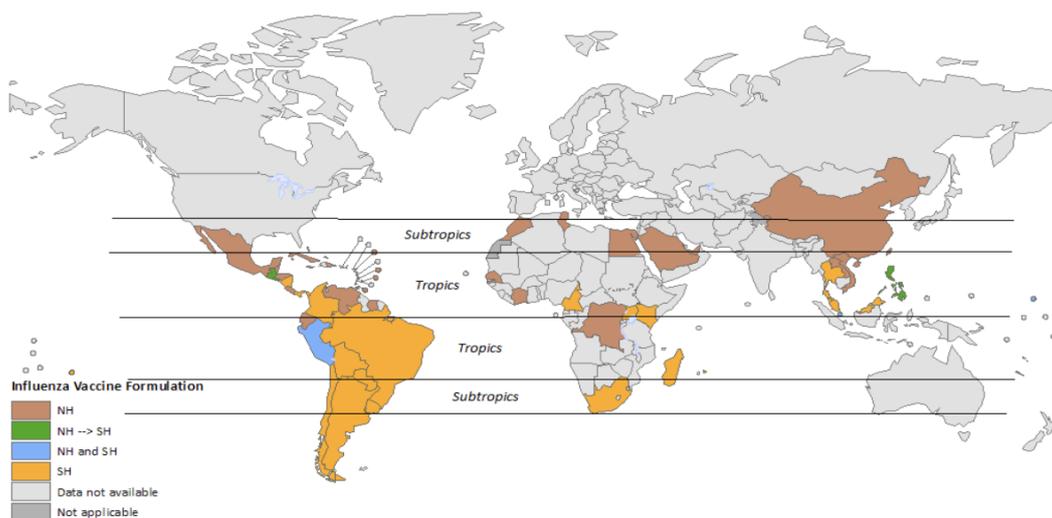


Figura 5. Zonas de vacunación de Influenza y formulación de vacuna aplicadas por los países tropicales y subtropicales. Los colores representan la formulación de la vacuna utilizada en cada región (36).

La OMS, ha emitido las siguientes recomendaciones de cepas para la vacuna trivalente contra la influenza del Hemisferio Norte 2023-2024:

Vacunas producidas en huevo:

- A/Victoria/4897/2022 (H1N1) pdm09;
- A/Darwin/9/2021 (H3N2);
- B/Austria/1359417/2021 (linaje B/Victoria).

Vacunas producidas a base de cultivos celulares con virus recombinantes:

- A/Wisconsin/67/2022 (H1N1) pdm09;
- A/Darwin/6/2021 (H3N2);
- B/Austria/1359417/2021 (linaje B/Victoria)

Para vacunas tetravalentes para usar en la temporada de influenza del hemisferio norte 2023 – 2024, la OMS recomienda la inclusión del siguiente componente del linaje B/Yamagata: B/Puket/3073/2013 (37).

Las recomendaciones de cepas para la vacuna trivalente contra la influenza del Hemisferio Sur 2024 son las siguientes:

Vacunas producidas en huevo:

- A/Wiscosin/67/2022 (H1N1) pdm09;
- A/Darwin/6/2021 (H3N2);
- B/Austria/1359417/2021 (linaje B/Victoria).

Vacunas producidas a base de cultivos celulares con virus recombinantes:

- A/Wiscosin/67/2022 (H1N1) pdm09;
- A/Darwin/6/2021 (H3N2);
- B/Austria/1359417/2021 (linaje B/Victoria).

Para vacunas tetravalentes para usar en la temporada de influenza del hemisferio sur 2024, la OMS recomienda la inclusión del siguiente componente del linaje B/Yamagata: B/Puket/3073/2013. No obstante, los virus de Influenza B/Yamagata ya no circulan en la población y, por lo tanto, es poco probable que causen futuras epidemias. A pesar de esto, los laboratorios continuarán realizando pruebas para detectar los virus B/Yamagata. Por lo tanto, el comité asesor de composición de vacunas de la OMS opina que ya no se justifica la inclusión del antígeno B/Yamagata como componente de la vacuna contra Influenza (38).

2. ESTRUCTURA DEL VIRUS, ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REPLICACION VIRAL

El Virus de Influenza es un virus envuelto, de ARN monocatenario segmentado y de polaridad negativa. La nucleocápside, de simetría helicoidal, contiene 8 regiones de ARN genómico que codifican para diez proteínas estructurales y no estructurales. Esto se puede observar en la Figura 6, que muestra el esquema de la estructura del virus de influenza. Las partículas virales miden aproximadamente entre 80 y 120 nm. de diámetro (39, 40).

El genoma del virus, sirve de molde para sintetizar el ARN mensajero viral. Todos los segmentos contienen secuencias terminales conservadas en los extremos 5' y 3', que además son parcialmente complementarias. Estas secuencias se encuentran asociadas entre sí y con el complejo de la polimerasa (41).

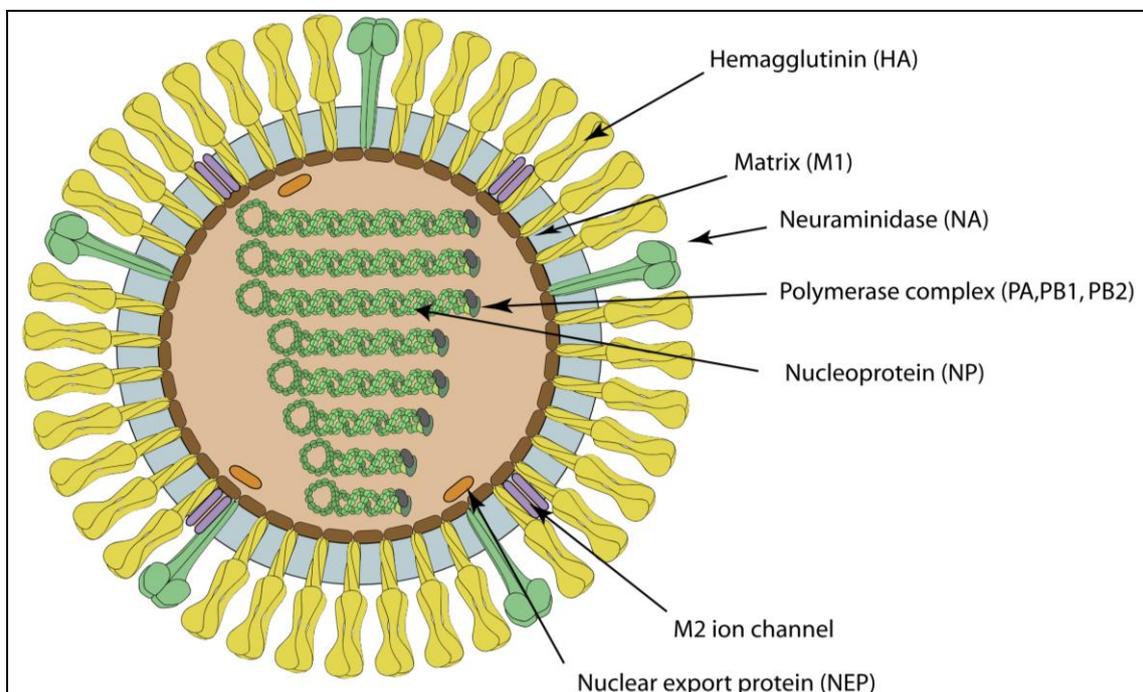


Figura 6. Representación esquemática de la estructura del virus de Influenza. El esquema ilustra la forma esférica del virión y las proteínas que son codificadas durante el proceso de replicación viral. Las glicoproteínas neuraminidasa y hemaglutinina se destacan en color verde y amarillo, respectivamente. (42).

Los segmentos de ARN del virus codifican para diferentes proteínas. Los segmentos del 1 al 6 codifican a una sola proteína cada uno: el segmento 1 codifica la proteína PB2, el segmento 2 la PB1, el segmento 3 para la proteína

PA, el segmento 4 codifica la HA, el segmento 5 la NP y el segmento 6 a la proteína NA. Por otro lado, el segmento 7 codifica para dos proteínas matriciales M1 y M2. Finalmente, el segmento 8 codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2. La proteína NS1 ha sido identificada en un bajo número de copias de los viriones, mientras, que la proteína NS2 no está presente en viriones pero es abundante en células infectadas (43, 44).

Continuando con el proceso de infección del virus de Influenza, dentro de la célula infectada se producen tres tipos de ARN virales: vARNs, que tienen polaridad negativa y se encapsidan en los viriones de la progenie. cARNs, que son de polaridad positiva, son copia complementaria de los vARNs y se acumulan en el núcleo de la célula infectada. mARNs, que también son de polaridad positiva, pero se diferencian de los cARNs por ser poliadenilados en su extremo 3' y contener estructura cap en extremo 5' (45).

El virus de Influenza utiliza más de la mitad de su información génica para formar la maquinaria de transcripción-replicación. Los moldes funcionales para estos procesos son las Ribonucleoproteínas (RNPs), que contienen cuatro proteínas virales: la polimerasa (PB1, PB2 y PA) y la NP (44).

Como se muestra en la Figura 7, la envoltura lipídica contiene tres proteínas de membrana: HA, NA y proteína M2. Cada una de estas proteínas presentan diferentes estados de agregación: La HA se encuentra formando homotrímeros mientras que la proteína NA y M2 forman homotetrámeros. Ambas, HA y NA están glicosiladas y contienen exclusivamente azúcares del tipo N-glicosídico. En contraste, no se ha reportado glicosilación de la proteína M2. Los tres polipéptidos de la envoltura son proteínas integrales de membrana, y tienen una región que se proyecta hacia el exterior del virión (ectodominio), una región transmembrana que atraviesa la envoltura y una región que se extiende hacia el interior de la partícula viral o cola citoplasmática (46).

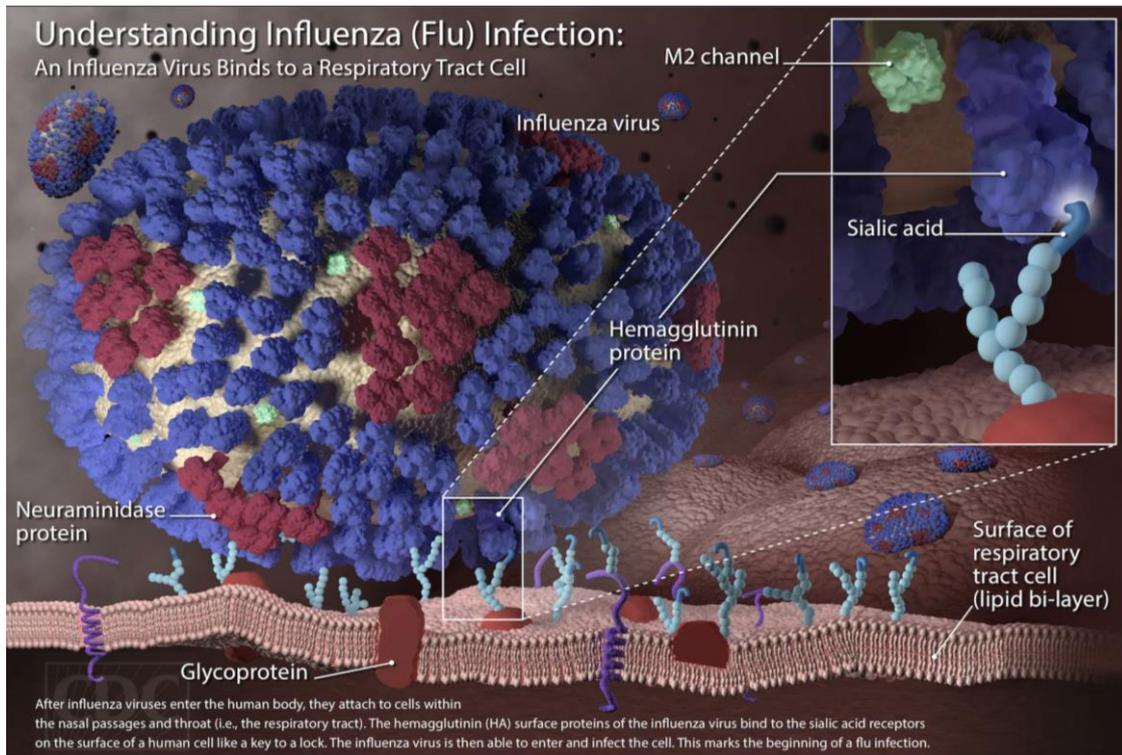


Figura 7. Unión del virus de Influenza a células del tracto respiratorio. De color morado se aprecia al homotrímero de la hemaglutina uniéndose al receptor celular de ácido siálico y a la proteína de la neuraminidasa con un color rojo oscuro, la cual escinde la unión de la hemaglutinina con el receptor celular (47).

La HA es una glicoproteína tipo I que contiene su extremo C-terminal en el interior de la partícula, mientras que la NA es una glicoproteína tipo II y tiene su extremo N-terminal intracelular. La agregación tetramérica de la proteína M2 permite que el conjunto de las regiones transmembrana forme un canal iónico que permite el paso de protones. Tanto la HA como la NA presentan dos regiones diferenciadas en el ectodominio que se proyecta hacia el exterior de la membrana: una región alargada y un dominio distal de forma globular. En estas regiones más distales reside el dominio proteico de la HA que interacciona con el receptor celular, y la región de la NA que posee la actividad de neuraminidasa que destruye el receptor celular (48).

2.1. Replicación viral

Como se puede visualizar en la Figura 8, el primer paso del proceso de replicación es la adsorción del virus a la superficie celular y su fusión. Para ello se necesita el receptor apropiado de la célula huésped y el sitio de adsorción en la partícula viral mediante la molécula HA1 (49).

La HA1 se une a los residuos de ácido-siálico de las glicoproteínas o glicolípidos en la superficie del receptor celular (Figura 7). En humanos el blanco del virus son las células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior, las especificidades de los receptores de la hemaglutinina dependen de la naturaleza del enlace glicosídico entre el ácido-siálico y el penúltimo residuo de galactosa del receptor (49, 50).

Los Virus de Influenza humana y de otros mamíferos se unen al enlace entre el ácido-siálico y la galactosa con una configuración α 2,6. En cuanto a los virus aviares, éstos se acoplan con uniones que tienen configuración α 2,3 lo que explica la ineficiente transmisión del virus de aves a humanos. Las HA de distintos virus Influenza han evolucionado para adaptar su sitio de unión. De este modo, la interacción con el receptor se constituye en un primer factor de especificidad de especie (51).

Los cerdos poseen receptores tanto para la configuración α 2,3 como α 2,6, lo que los hace susceptibles para la transmisión de influenza humana como para la infección por influenza aviar. La existencia de una coinfección con estos dos virus es el principal mecanismo de aparición de un nuevo virus de Influenza con potencial pandémico (52).

En relación con el proceso de replicación viral, este comienza cuando el virus penetra en la célula a través de la endocitosis mediada por receptores. Una vez dentro, el virus es transportado al interior de la célula a través de la vía normal mediada por vesículas recubiertas de clatrina/endosomas. Dentro de la vesícula, el pH bajo causa una alteración de la conformación de la espícula HA, lo que conduce a la exposición del extremo amino hidrófobo de la proteína HA2 (49).

El ambiente ácido de los endosomas provoca la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática del endosoma, desnudando la nucleocápside y liberando las RNP al citoplasma. El descenso de pH también activa el flujo de protones desde el endosoma al interior de la partícula, mediado por la proteína M2 presente en la membrana viral. La activación de M2 induce el descenso del pH en el interior de la partícula viral y consiguientemente la desestabilización de las interacciones entre las RNPs y la M1 que las recubre (49).

Este proceso se encuentra representado en el paso 2 de la Figura 8, en la cual, se puede observar la pérdida del cápside y liberación del genoma viral debido a como se explicó en el párrafo anterior, el canal iónico M2 permite que los protones se muevan a través de la envoltura viral y acidifiquen el núcleo del virus dando como resultado la liberación del ARN viral y las proteínas centrales (47).

Las partículas virales que contienen HA que no han sido procesadas proteolíticamente, se adsorben a las células, pero no son internalizadas. Los complejos de RNP no permanecen en el citoplasma, sino que migran hacia el núcleo. Esto se debe a que la ARN polimerasa del virus de la influenza no puede iniciar la transcripción de los segmentos del genoma de ARN de cadena negativa en ARN mensajeros sin un cebador. Para este fin, utiliza la región 5´terminal de los ARN mensajeros celulares que son sintetizados en el núcleo (50).

Las proteínas centrales y el ARN viral forman un complejo que fueron transportados al núcleo celular, donde la ARN polimerasa dependiente de ARN comienza a transcribir el ARN viral complementario de sentido positivo (Pasos 3a y 3b de la Figura 8). La síntesis de ARNm requiere estimulación previa de la síntesis de ARN de la célula huésped, el ARNm es transportado al citoplasma y se traduce (paso 4 de la Figura 8) dirigiendo la síntesis de proteínas virales (53, 54).

La transcripción del ARN mensajero no prosigue hasta el final de las cadenas negativas de ARN, sino que se detiene unos 20 nucleótidos antes de la terminación debido a que allí hay señales de poliadenilación en todos los segmentos del genoma. Por lo tanto, los ARN mensajeros del virus de la influenza poseen secuencias heterogéneas de 10 a 13 nucleótidos de longitud en el extremo 5´ tomadas de los ARN mensajeros de la célula huésped (55).

En cuanto a las proteínas virales recién sintetizadas se secretan a través del aparato de Golgi hacia la superficie celular (en el caso de la neuraminidasa y la hemaglutinina, paso 5b). Alternativamente, pueden ser transportadas de regreso al núcleo para unirse al ARN viral y formar nuevas partículas del genoma viral (paso 5a de la Figura 8) (49).

La biosíntesis de proteínas tardías marca el fin de la acción de las proteínas tempranas. Estas proteínas tardías o estructurales, originan los capsómeros y la cápside. A las 2 - 3 horas posinfección (pi), se detecta ARN polimerasa dependiente del ARN y NP, que alcanza su concentración máxima a las 5 - 6 horas pi. Las proteínas de envoltura HA, NA y M2 son sintetizadas en el citoplasma sobre las membranas de los poliribosomas y se detectan a las 3 horas pi. Estas migran hacia la membrana celular, vía retículo endoplasmático y complejo de Golgi (paso 5b), y al mismo tiempo, se van incorporando las cadenas laterales de hidratos de carbono, donde se almacenan, para luego dirigirse a la cara interna de la membrana plasmática (55).

Por otro lado, un grupo de proteínas virales se transportan de regreso al núcleo para unirse al ARN viral y formar nuevas partículas del genoma viral (paso 5a de la Figura 8). (55).

El ensamble, es la siguiente etapa, una vez finalizada la biosíntesis viral, que transcurre en compartimentos celulares diferentes. La localización nuclear de las proteínas M y NS2 es esencial para la migración de las RNP fuera del núcleo para el ensamble de la progenie viral en el citoplasma (42).

Los segmentos de membrana celular que contienen las HA y NA envuelven a los antígenos internos virales y se inicia la brotación que progresa hasta que emerge la nueva partícula (paso 6). Los viriones adquieren envoltura y sufren maduración a medida que van saliendo de la membrana celular del hospedador. La etapa final es la liberación de la progenie viral al exterior celular; la hemaglutinina sufre clivaje proteolítico por las enzimas del huésped. Este proceso es necesario para que las partículas liberadas sean infecciosas. (56).

A continuación, los viriones recién sintetizados tienen en su superficie glicoproteínas que contienen ácido siálico como parte de su estructura de carbohidratos, y por tanto son vulnerables a auto-aglutinación por la hemaglutinina. La principal función de la neuraminidasa viral es la remoción de esas partículas y promover la liberación del virus (paso 7). La replicación viral produce la muerte de la célula infectada (57).

En resumen, el proceso puede ser descrito en 7 pasos: 1.- Adsorción, 2.- liberación del material genético y migración al núcleo, 3.- replicación y transcripción del ARN viral, 4.- exportación y traducción del ARN viral al citoplasma, 5.- secreción de nuevos virus a través del aparato de Golgi o transporte de regreso al núcleo para unirse al ARNv y formar nuevas partículas genómicas virales, 6.- El ARNv y las proteínas de la envoltura migran desde el núcleo al citoplasma en donde se ensamblan, 7.- Brotamiento y liberación de los nuevos virus (56).

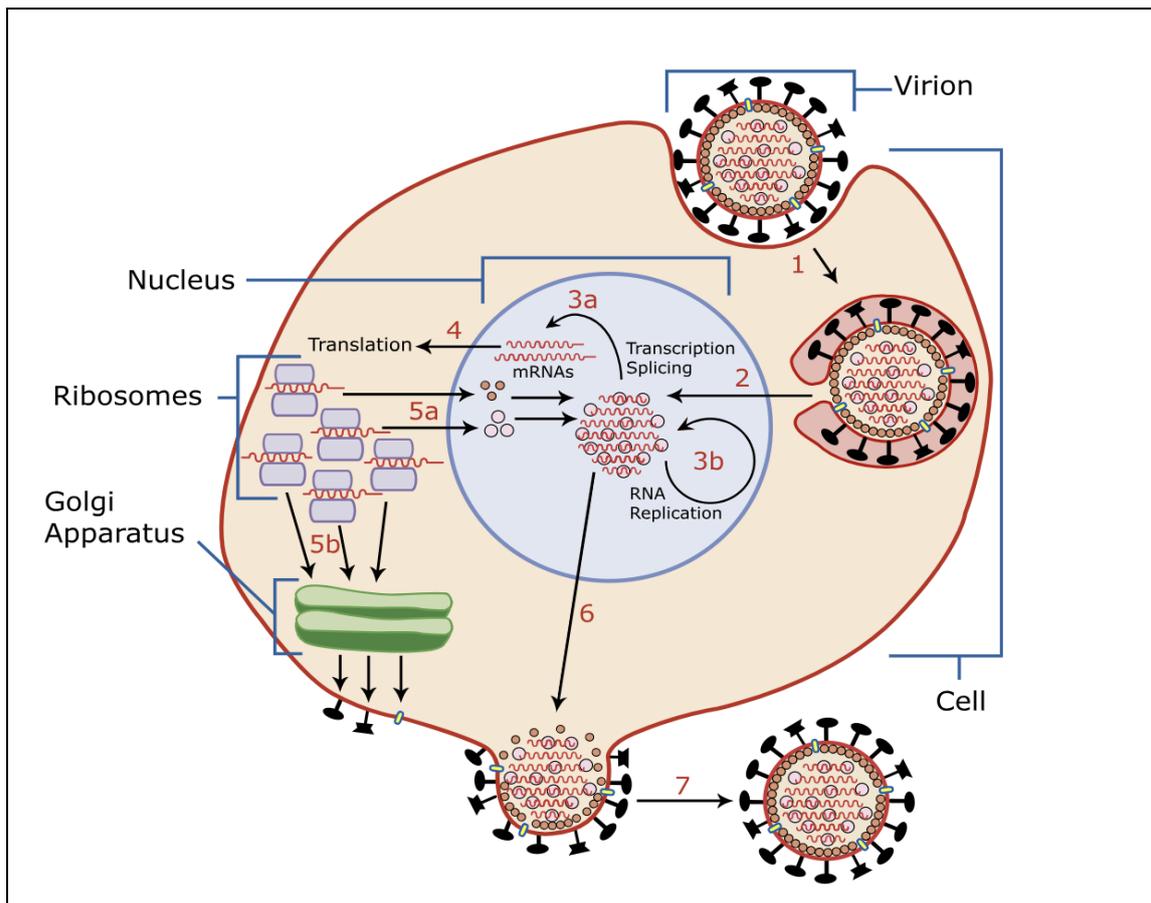


Figura 8. Ciclo de replicación del virus de Influenza. Describe las etapas del proceso de replicación viral: paso 1: Fusión del virus con la membrana celular. paso 2: Entrada del genoma viral en el citoplasma celular. paso 3: Formación y transcripción del complejo de replicación viral. paso 4: Traducción de proteínas virales. paso 5: Secreción de proteínas virales. paso 6: Ensamblaje de nuevas partículas virales. paso 7: Liberación de nuevas partículas virales fuera de la célula (49).

2.2. Datos genéticos y evolutivos del virus de Influenza en América y el mundo 2015 – 2023.

2.2.1. Influenza A/H1N1 pdm09

Desde su aparición en 2009, los virus de Influenza A/H1N1 pdm09 han continuado propagándose a nivel mundial. Según los estudios filogenéticos del gen hemaglutinina, estos se han clasificado en 9 grupos genéticos principales y varios subgrupos. El grupo 1, incluye al A/California/07/2009. Durante 2010, los virus mostraron una gran diversidad agrupándose en cuatro clados genéticos: 1, 3, 5 y 7. En 2011, los clados 5 y 7 predominaron, junto con los clados 2, 3 y 6B. Posteriormente, la mayoría de virus pertenecían al clado 6, que se puede subdividir en tres subgrupos (6A, 6B y 6C), basándose en los cambios característicos en los residuos de los aminoácidos, como se puede observar en la Figura 9 (58, 59).

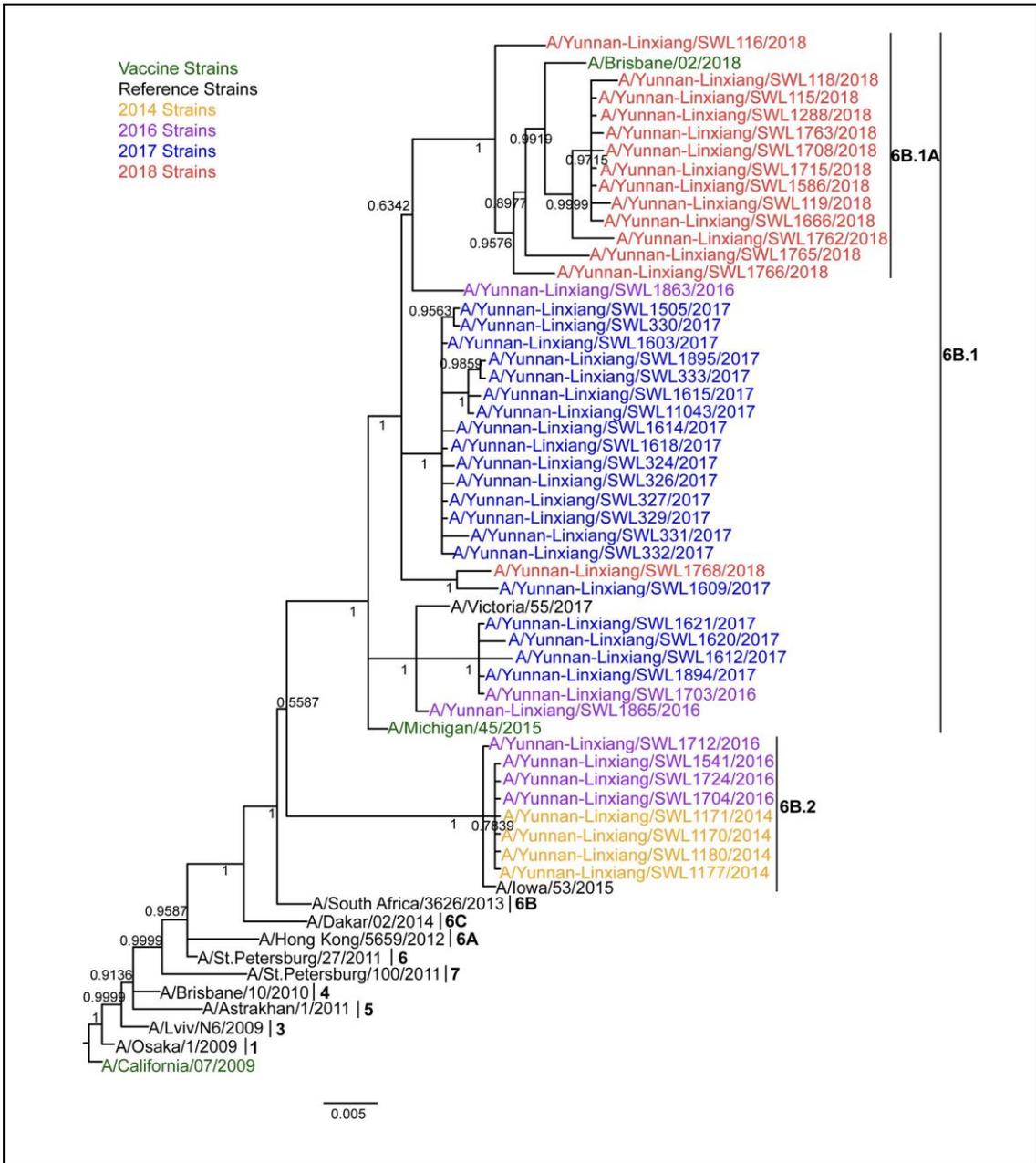


Figura 9. Filogenia de la hemaglutinina del virus de Influenza A/H1N1 pdm09 (58). Los colores representan el origen de las cepas de la siguiente manera: el verde indica las cepas vacunales, el negro representa las cepas de referencia, el amarillo las cepas del 2014, el lila representan las cepas del 2016, el azul las cepas del 2017 y el rojo las cepas del 2018. Los números del 1 al 7 indica el número de clados. El valor de la escala (0,005) representa la distancia genética entre las cepas.

Continuando con el proceso de evolución del virus, durante 2015, se observó que la actividad de A/H1N1 pdm09 ha sido variable, con brotes significativos en el subcontinente indio y algunas regiones de África. Desde 2009, la OMS ha recomendado el virus A/California/07/2009 como componente de la vacuna.

Esta cepa se incluyó en la temporada de gripe 2015 en el hemisferio sur y la temporada 2015 – 2016 en el hemisferio norte. Esto se debe a que la mayoría de virus A/H1N1 pdm09 analizados mostraron una similitud antigénica con este virus de la vacuna y pertenecían al grupo genético 6B (60).

A partir de diciembre 2015, se observó un incremento en la actividad del virus A/H1N1 pdm09 en Asia, Europa, América del Norte y varios países de África y América Central o del Sur, lo que resultó en brotes a gran escala. La OMS recomendó el virus A/California/07/2009 como componente de la vacuna para la temporada de gripe 2016 en el hemisferio sur (SH) y la temporada de gripe 2016-2017 en el hemisferio norte (NH). El grupo genético 6B del virus continuó circulando y se diversificó en los subgrupos 6B.1 y 6B.2. Los virus del subgrupo genético 6B.1 predominaban a nivel mundial, mientras que los virus del subgrupo 6B.2 se detectaron con mayor frecuencia en algunos países de Asia, especialmente en China (61).

En septiembre de 2016, en la reunión de consulta de la OMS, se recomendó un virus similar al A/Michigan/45/2015 (subgrupo 6B.1) como componente para uso en la temporada de gripe del hemisferio sur del 2017, esta formulación fue recomendada para proporcionar una mejora incremental en la protección proporcionada contra los virus A/H1N1 pdm09 que circulaban en aquel entonces (62).

Desde febrero a septiembre de 2017, la actividad global de la influenza debida a los virus A/H1N1 pdm09 fue baja. La gran mayoría de los virus circulantes pertenecían a la subclase filogenética 6B.1. De los virus A/H1N1 pdm09 caracterizados, la mayoría ha sido antigénicamente indistinguible del virus de la vacuna 2018-2019 A/Michigan/45/2015 (63).

Sin embargo, durante la estación de influenza 2018 - 2019, los virus A/H1N1 pdm09 fueron predominantes en numerosos países de Asia, Europa y América del Norte. La mayoría de los virus circulantes pertenecían al subclado filogenético 6B.1A, que evolucionó a partir del clado 6B.1. Los virus A/H1N1 pdm09 circulantes fueron antigénicamente indistinguibles del virus vacunal

2018-2019 del hemisferio norte y 2019 del hemisferio sur A/Michigan/45/2015 (64).

En las temporadas 2019-2020, los virus A/H1N1 pdm09 predominaron en muchos países de Asia, África, Europa, América del Norte y América del Sur. La mayoría de estos virus se encontraban agrupados dentro del subclado filogenético 6B.1A, los cuales tenían una considerable diversidad genética y se caracterizan por una sustitución S183P en la Hemaglutinina (65).

Posteriormente, en las temporadas de Influenza de los años 2021 – 2022 en el hemisferio norte, 2022 del hemisferio sur y 2022-2023 del hemisferio norte, ha circulado en bajas cantidades el subtipo A/H1N1 pdm09. Sin embargo, se observó un incremento en África, Europa, Asia Meridional y Occidental durante la estación de influenza del hemisferio norte del 2022 – 2023. La mayoría de A/H1N1 pdm09 que fueron colectados desde 2020 pertenecieron al clado 5a, que posteriormente diversificó en 5a1 y 5a2, los cuales, continúan co-circulando (66).

Además, los virus que expresan genes HA del clado 5a.1 presentan sustituciones D187A y Q189E (por ejemplo, A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 y A/Hawaii/70/2019). Los virus dentro de los subclados 5a.1 circularon en mayores proporciones en África y América Central/Sur durante la temporada de influenza del hemisferio norte 2022-2023 en comparación con otras áreas geográficas. Análisis antigénicos demostraron que las vacunas del hemisferio norte 2020-2021 del clado 5a.1 inhibieron escasamente los virus del clado 5a.2, pero inhibieron bien la mayoría de virus circulantes del clado 5a.1 (67).

Por otro lado, el clado 5a.2 evolucionó con las sustituciones de aminoácidos K130N, N156K, L161I y V250A (por ejemplo, A/Wisconsin/588/2019 y A/Victoria/2570/2019) que son importantes epítomos antigénicos en la HA. Análisis antigénicos con antisueros de hurón ahora por el contrario inhibieron bien los virus que expresan el clado 5a.2, y poco a los virus 5a.1 (67).

En este contexto, el clado 5a.2 experimentó una diversificación adicional, dando lugar al subclado 5a.2a. Este subclado se caracteriza por las siguientes

sustituciones adicionales de aminoácidos de HA1: K54Q, A186T, Q189E, E224A, R259K, Y K308R (A/Sydney/5/2021). Para los virus 5a.2a que tienen mutaciones adicionales P137S, K142R, D260E y T277A, se designan como subclado 5a.2a.1 (68).

Los virus agrupados en los subclados 5a.1, 5a.2a y 5a.2a.1, circularon durante la temporada de Influenza del hemisferio norte 2022-2023 en diferentes proporciones. Los análisis antigénicos demostraron que los virus del clado 5a.1 y 5a.2 son antigénicamente distintos entre sí, sin embargo, los antisueros de hurón producidos frente a los virus 5a.2 no reconocen las diferencias entre los subclados 5a.2a y 5a.2a.1, aunque tienen cambios en los sitios antigénicos conocidos en comparación con 5a.2 (69, 70).

La caracterización antigénica utilizando sueros humanos que fueron vacunados durante la temporada de influenza del hemisferio sur del 2022, reveló que aquellos individuos que recibieron la vacuna con virus del clado 5a.2 (A/Wisconsin/588/2019 o A/Victoria/2570/2019), presentaron una disminución en las respuestas de anticuerpos frente a los virus de los subclados 5a.2a y 5a.2a.1. Estos hallazgos respaldaron las recomendaciones de la OMS de utilizar virus similares a A/Wisconsin/67/2022 o A/Victoria/4897/2022 (5a.2a.1) como componente de la vacuna A/H1N1 pdm09 para el hemisferio norte 2023-2024. A nivel global, se ha observado que la mayoría de los virus A/H1N1 pdm09 son susceptibles a los antivirales oseltamivir, zanamivir, peramivir, laminamivir y baloxavir (70).

2.2.2. Influenza A/H3N2

En lo referente a los virus de Influenza A/H3N2, muchos subclados han evolucionado en los últimos años, lo que representa un desafío significativo para la selección de una cepa de virus de Influenza eficaz para la composición de la vacuna. Desde 2011, el clado 3 ha estado circulando y evolucionó en 3 subclados principales designados como 3A, 3B y 3C. En la actualidad, el subclado 3C ha sido predominante conteniendo varios subclados genéticos que circulan conjuntamente, tales como 3C.2a, 3C.2a1 y 3C.3a con cambios característicos de cada clado o subclado (Figura 10) (59, 71).

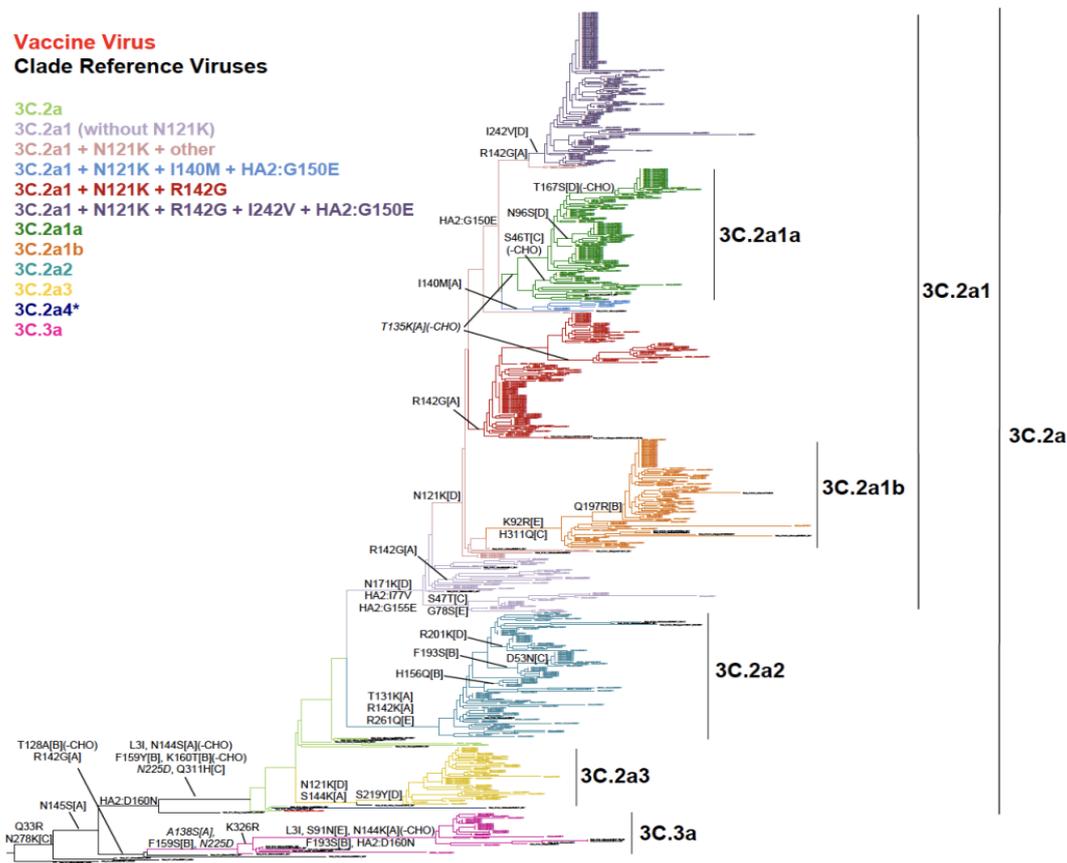


Figura 10. Filogenia de la hemaglutinina del virus de Influenza A/H3N2 (71). Los colores detallan las diferentes secuencias correspondientes a los clados y subclados del virus A/H3N2. Se pueden observar los cambios de aminoácidos característicos a cada grupo genético.

Durante 2015, los virus A/H3N2 predominaron en muchas regiones del mundo. El virus A/Switzerland/9715293/2013, que venían circulando desde el 2014, fue recomendado por la OMS como componente para la temporada de gripe 2015 – 2016. Sin embargo, un grupo de A/H3N2 que predominaba a finales del 2015, fueron mejor inhibidos con un virus similar al A/Hong Kong/4801/2014. Por este motivo, fue utilizado como componente para la composición de la vacuna antigripal del hemisferio sur del 2016 (72).

Además de lo anterior, los estudios de secuencias genéticas mostraron que los genes de la HA de los virus H3N2 se dividían en varios grupos genéticos. Los virus de los grupos 3C.3, 3C.3b, 3C.2 y 3C.2b eran en su gran mayoría antigénicamente similares al anterior virus vacunal A/Texas/50/2012. Por otro

lado, los virus del subgrupo genético 3C.2a, estaban representados por A/Hong Kong/4801/2014 y 3C. 3a, era similar a A/Switzerland/9715293/2013 (73).

En el 2016 la actividad de Influenza A/H3N2 fue baja, con brotes regionales o locales notificados en América, Asia, Europa y Oceanía. Los análisis de secuencias revelaron que los genes HA de los virus A/H3N2, divergieron en varios grupos genéticos, predominando los virus de los subgrupos genéticos 3C.2a, representados por A/Hong Kong/4801/2014. El subgrupo genético 3C.3a, representado por A/Switzerland/9715293/2013, continuó circulando en niveles bajos y también se identificó un pequeño número de 3C.3b (74).

Durante la temporada de influenza 2017-2018, se observó una alta actividad de los virus A/H3N2 en América del Norte, alcanzando su punto máximo a finales de enero y principios de febrero de 2018. En esta parte del continente, la mayoría de los virus de influenza A/H3N2 estaban genéticamente relacionados con el clado filogenético 3C.2a, con una proporción menor perteneciente al virus 3C.2a1 (representado por A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016). Los subclados filogenéticos HA 3C.2a también predominaron en otras regiones del mundo, a excepción de Asia, donde los virus 3C.2a1 fueron los más comunes (75).

Por otro lado, los virus que pertenecen al 3C.3a (representado por A/Switzerland/9715293/2013), continuaron circulando a niveles bajos en América del Norte, América Central y América del Sur. Por lo tanto, la OMS recomendó el A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 como virus de la vacuna A (H3N2) para las temporadas de influenza 2018 del hemisferio sur y 2018-19 del hemisferio norte. Sin embargo, debido a la acelerada tasa de mutación del virus y su gran variabilidad genética, fue necesario actualizar la recomendación de cepa vacunal para este subtipo con A/Kansas/14/2017 (75).

En el período 2018-2020, los virus de Influenza A/H3N2 co-circularon con los virus A/H1N1 pdm09 en diversas regiones geográficas, aunque en menor medida. En EEUU, la circulación del subtipo A/H3N2 se incrementó a partir de mediados de febrero del 2019, convirtiéndose en el subtipo predominante hasta el final de la temporada. Se detectaron múltiples clados filogenéticos de HA; el subclado 3C.2a1 experimentó un aumento, mientras que los virus del

clado 3C.2a disminuyeron. Los virus del clado 3C.3a resurgieron en varias regiones geográficas y se convirtieron en los más predominantes entre los virus detectados en EEUU (76).

En algunos países de Europa, Asia y África los virus A/H3N2 fueron los más predominantes. Un análisis filogenético reveló que los virus 3C.2a y 3C.3a, que se identificaron como los principales clados, estaban co-circulando a nivel mundial. Se observó una evolución en muchos subclados divergentes 3C.2a, con la mayoría de los virus pertenecientes a los subclados 2a1b. Los virus del clado 3C.3 a continuaron aumentando en varias regiones y se convirtieron en los más predominantes en Europa. En otras regiones, los virus pertenecientes al subclado 3C.2a1b circularon en menor cantidad (77).

Durante la temporada de gripe 2021-2022 y 2022-2023 circulaban virus A/H3N2 pertenecientes al clado 3C.2a1b.2a con sustituciones adicionales de aminoácidos en la región de la hemaglutinina de T131K, V529I, K83E, Y94N e I522M. Por este motivo, los virus vacunales similares a A/Hong Kong/45/2019 (clado 3C.2a1b.1b), mostraron una neutralización reducida frente a los subclados emergentes 3C.2a1b.2a (78, 79).

En febrero del 2021, la recomendación de la OMS para la composición de las vacunas contra la gripe del hemisferio norte 2021-2022 incluye una actualización del componente con la inclusión de la cepa A/Cambodia/e0826360/2020 perteneciente al subclado 1a. Mientras que los virus 3C.2a1b.2a de los subclados 1a, 1b, y 2a y 2b comparten sustituciones en epítomos antigénicos de la hemaglutinina (F193S e Y195F), cada subclado adicionalmente cuenta con sustituciones adicionales en la HA. Los virus del subclado 1 tienen la mutación G186S y S198P y los virus del subclado 2 comparten Y159N, T160I (pérdida de sitio de glicosilación, Tabla 1), L164Q, G186D y D190N (80).

Por otro lado, los virus del subclado 2 fueron bien reconocidos por A/Darwin/6/2021 que también es del subclado 2, pero presento una baja respuesta frente a los virus del subclado 1. Mientras que al inicio ambos subclados co-circulaban, la mayoría de los virus desde 2021 pertenecen al subclado 2, lo que llevó a la OMS a recomendar virus similares a

A/Darwin/9/2021 o A/Darwin/6/2021 como componente vacunal para 2022 y 2023. Sin embargo, los virus del subclado 1 han seguido circulando en China (68).

En este contexto, los virus del subclado 2 han continuado su evolución, dando lugar a nuevos subclados 2a hasta 2d con sustituciones adicionales de HA. Los virus que son similares a A/Darwin/6/2021 siguen reconociendo bien la mayoría de los virus del subclado 2a y al subclado 2. Estos datos respaldan la recomendación de la OMS del uso de esta cepa como componente de las vacunas del hemisferio sur 2023 y hemisferio norte 2023-2024, aunque su capacidad para inhibir a los virus del subclado 1 es limitada. La mayoría de los virus A/H3N2 analizados mostraron una inhibición normal frente a oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir y baloxavir (74, 81).

2.2.3. Virus de la influenza B

Anualmente, los virus de Influenza B desencadenan epidemias a nivel mundial, representando cerca de un tercio de la carga global de enfermedad por Influenza. Estos virus están vinculados a infecciones severas en niños. Aunque las tasas de hospitalización y mortalidad atribuidas a Influenza B son inferiores a las provocadas por el subtipo A/H3N2, son superiores a las causadas por el virus A/H1N1 estacional, no obstante, se conoce muy poco acerca de sus características epidemiológicas, su capacidad antigénica y su dinámica de evolución viral (82).

El virus de Influenza B, se aisló por primera vez en 1940, luego se clasificó en dos linajes distintos B/Yamagata/16/88 y B/Victoria/2/87, que divergieron en 1970. Los linajes Yamagata y Victoria han estado co-circulando a nivel global, alternando en el dominio regional o local desde al menos el 2002. Estos linajes tienen una variación antigénica y evolución molecular más lenta en comparación con los virus de Influenza tipo A, sin embargo, se han producido disparidades por desajustes antigénicos entre los linajes predominantes y las vacunas de Influenza trivalente, motivo por el cual ha sido necesario introducir las vacunas tetravalentes en algunos países (83).

El linaje Yamagata se ha separado en dos clados principales, el clado 2 y el clado 3, tal como se puede observar en la Figura 11; por el contrario, los virus de Influenza B del linaje Victoria, evidencia un reordenamiento continuo entre clados a lo largo del tiempo entre los virus B/Brisbane/60/2008 del clado 1A, B/Odessa/3886/2010 del clado 1B y B/Malaysia/2506/2004 (83).

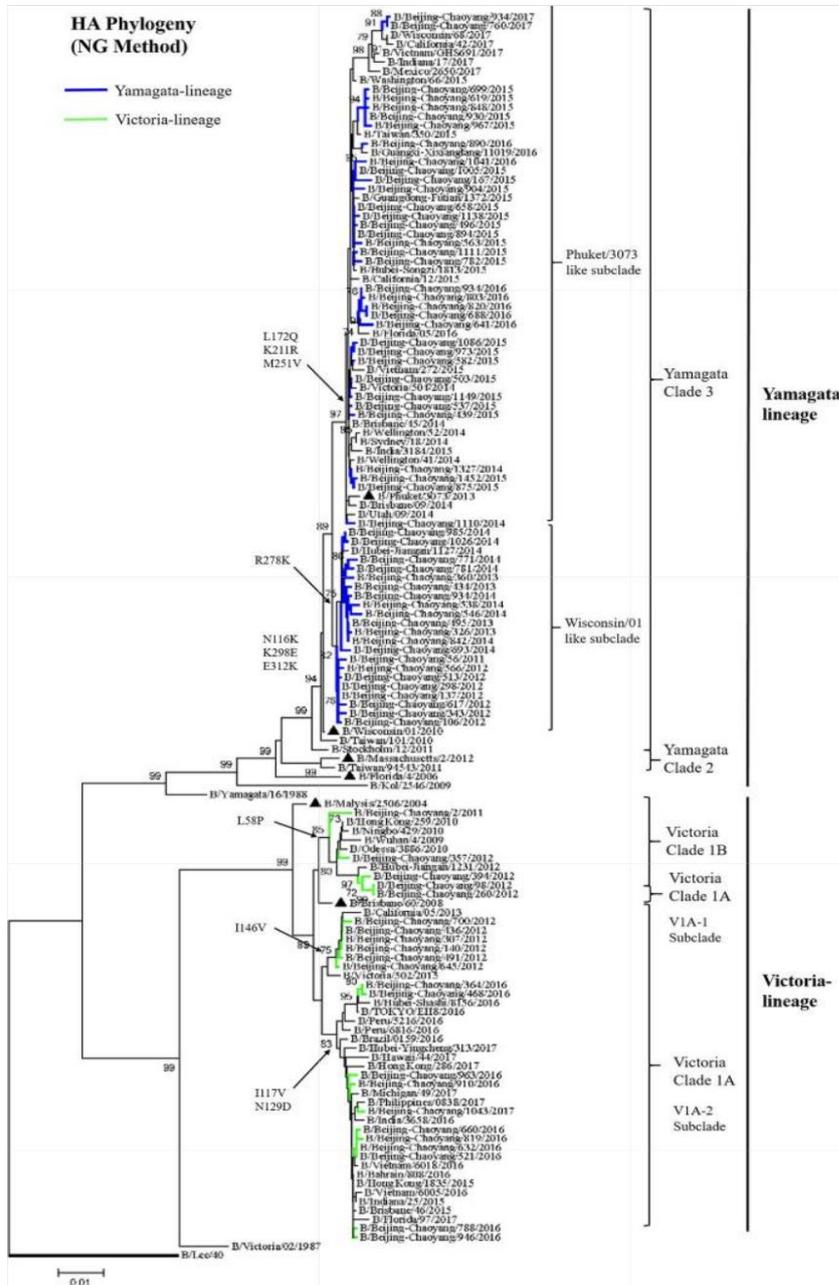


Figura 11. Árbol Filogenético de la región de la HA de los virus de Influenza B (83). El diagrama muestra las relaciones evolutivas entre diferentes cepas del virus. Las sustituciones clave de aminoácidos se indican con flechas. Los linajes Yamagata y Victoria se destacan en color azul y verde, respectivamente.

En el verano de 2015, se observó una co-circulación de los linajes Victoria y Yamagata. Sin embargo, en los países de Oceanía, la proporción de virus del linaje B/Victoria aumentó rápidamente. Por lo tanto, en la reunión de consulta sobre vacunas de la OMS celebrada en septiembre 2015, un virus similar a B/Brisbane/60/2008, del linaje Victoria fue recomendado como componente de la gripe B de las vacunas trivalente y tetravalente para la temporada de gripe del hemisferio sur del 2016 (84).

Además, durante la temporada de influenza 2017-2018, los virus del linaje B/Yamagata/16/88 circularon en todo el mundo y fueron los virus de influenza más comúnmente detectados en Europa y algunos países de Asia. Se identificaron virus de influenza B/Victoria/2/87 en muchas regiones, pero en niveles bajos. Todos los virus del linaje B/Yamagata caracterizados pertenecían al clado Y3 filogenético HA (85).

Por otro lado, la mayoría de los virus del linaje B/Victoria detectados en África, Asia y Oceanía pertenecían al clado genético V1A y fueron bien inhibidos por los antisueros de hurón generados contra B/Brisbane/60/2008, (virus vacunal para las temporadas de influenza 2017-2018 del hemisferio norte y 2018 del hemisferio sur). Los virus de la subclase genética V1A.1, continuaron propagándose geográficamente y se convirtieron en los virus predominantes del linaje B/Victoria que circulan en las Américas y Europa (86).

Estos virus de la subclase V1A.1 fueron poco inhibidos por los antisueros de hurón producidos contra B/Brisbane/60/2008, pero estaban bien inhibidos por los antisueros de hurón producidos contra B/Colorado/06/2017, un virus de referencia V1A.1, recomendado por la OMS como el componente de vacuna del linaje B/Victoria para la temporada 2018-19 de influenza para el hemisferio norte. Además, un pequeño número de virus V1A detectados en Asia y África tienen una eliminación de tres aminoácidos (162-164) en la proteína HA (87).

Durante las temporadas de Influenza B del 2018-2019, la incidencia fue notablemente baja a nivel global, con la excepción de algunos países en Asia, África y América del sur, donde se observaron las tasas más altas.

En cambio, en el 2019-2020 los virus de Influenza B circularon en mayor proporción que los virus de la gripe A en algunos países de América, Europa, Asia Occidental y Central. Los Virus del linaje B/Victoria/2/87 circularon en mayor proporción que los virus del linaje B/Yamagata/16/88 en todo el mundo, excepto en algunos países de América Central y del Sur (88).

El estudio filogenético de los virus B/Victoria muestra que todos los segmentos del gen de la hemaglutinina pertenecían al clado genético V1A. Este clado tenía varios subclados antigénicamente distintos que habían estado co-circulando durante 2018-2020. En particular, los virus que expresaban proteínas HA con una deleción de los aminoácidos 162-163, pertenecían al subclado V1A.1. Además, los virus con una deleción de tres aminoácidos (162-164) en la hemaglutinina, los virus habían evolucionado en dos subclados V1A.2 y V1A.3. Es importante destacar que desde 2019, la proporción de virus similares a B/Victoria del subclado V1A.3 han aumentado en todo el mundo (89).

En lo que respecta a los virus del linaje B/Yamagata caracterizados, todos han pertenecido al clado filogenético Y3. Estos fueron bien inhibidos por antisueros de hurón producidos contra virus B/Phuket/3073/2013 (Y3). En este contexto, la recomendación de la OMS para la composición de las vacunas antigripales tetravalentes para las temporadas del hemisferio norte 2020-2021, incluye un virus similar al B/Phuket/3073/2013 (90).

Durante la temporada de gripe 2021-2022, la circulación del tipo B fue baja a nivel global, excepto en China. Sin embargo, en la temporada 2022-2023, los virus de gripe B y A co-circularon, siendo detectados en mayores proporciones en África, Asia, Europa y Sudamérica. La mayoría de los virus del linaje Victoria durante este período pertenecen al clado V1A.3, caracterizados por la deleción de tres aminoácidos del 162 al 164. Aunque, estos virus continuaron circulando durante 2022-2023, su proporción fue menor en comparación con los virus de la gripe A. La mayoría de los virus B/Victoria pertenecen a los subclados V1A.3a.1 y V1A.3a.2 y comparten sustituciones de hemaglutinina N150K, G184E, N197D (pérdida del sitio putativo de glicosilación, Tabla 1) y R279K. Los virus V1A.3a.1, que comparten las sustituciones de HA V220M y P241Q, se han detectado principalmente en China durante 2021-2022; mientras que los

virus V1A.3a.2, que comparten las sustituciones HA AA P144L Y K203R, predominaron en todo el mundo durante la temporada del hemisferio norte 2022-2023 (91).

Desde el 1 de febrero del 2023, todos los virus de Influenza B que se han caracterizado y han continuado en circulación son del linaje B/Victoria/2/87. Los genes HA de los subclados 3a2 (o 1a.3a.2) se encuentra en la mayoría de los virus más recientes. En América del Norte y Central, se han identificado algunos virus que pertenecen al clado 1A.3. Los antisueros de hurón post-infección, que se generaron en respuesta a los virus similares a B/Austria/1359417/2021 (3a.2) propagados en cultivo celular y huevo, reconocieron bien a casi todos los virus en circulación. Según los ensayos de serología humana, los títulos medios post-vacunación contra los virus representativos del linaje B/Victoria que expresaban genes HA 3a.2 no mostraron reducción significativa en comparación con los títulos contra el virus vacunal B/Austria/1359417/2021, ya sea propagado en huevo o en cultivo celular (38).

En relación con los virus del linaje B/Yamagata/16/88 que se analizaron hasta marzo 2020 tenían segmentos del gen HA pertenecientes al clado filogenético Y3. Estos virus fueron eficazmente bien inhibidos por antisueros de hurón contra el virus B/Phuket/3073/2013 (Y3). Sin embargo, a partir de abril 2020, se ha observado una disminución significativa en la circulación de virus del linaje B/Yamagata. No existen reportes de circulación de este linaje y no han estado disponible cepas para pruebas antigénicas. La recomendación de la OMS para el componente B/Yamagata de vacunas antigripales tetravalentes sigue siendo similar a B/Phuket/3073/2013 para la formulación del hemisferio sur 2024. No obstante, considerando que no existe circulación a nivel global de este linaje, el comité asesor de vacunas de la OMS sugiere no incluir el antígeno B/Yamagata como componente en las siguientes vacunas contra influenza (38, 92).

En la Tabla 1, se presenta un resumen de las principales mutaciones de aminoácidos que se describen en los párrafos anteriores. Estas mutaciones están asociadas a cambios en los sitios de glicosilación. Los sitios de

glicosilación son regiones específicas donde se añaden cadenas de azúcar, un proceso conocido como glicosilación. Las mutaciones en estos sitios pueden tener un impacto significativo en la estructura y función de la HA, afectando la capacidad del virus para infectar células huésped y evadir el sistema inmunológico (93).

Tabla 1. Resumen de cambio de aminoácidos con efecto en el sitio de glicosilación. (94)

Cambio de Aminoácido	Efecto en Sitio de Glicosilación
T160I	Pérdida de sitio de glicosilación
N96S	Ganancia de sitio de glicosilación
N197D	Pérdida de sitio de glicosilación
T128A	Pérdida de sitio de glicosilación
I160T	Ganancia de sitio de glicosilación
D7N	Ganancia de sitio de glicosilación
N144K	Pérdida de sitio de glicosilación
S162N	Ganancia de sitio de glicosilación
N144S	Pérdida de sitio de glicosilación
K160T	Ganancia de sitio de glicosilación
N122D	Pérdida de sitio de glicosilación
T135K	Pérdida de sitio de glicosilación
N144D	Pérdida de sitio de glicosilación
S45N	Ganancia de sitio de glicosilación

2.2.4. Influenza H5N1

Mientras tanto, en el ámbito de la Influenza aviar, los virus H5N1 altamente patógena (HPAIV) representan una de las principales amenazas para la salud animal, causando pérdidas importantes en la industria avícola y afectando las poblaciones de aves silvestres. Además, estos virus son una amenaza permanente para la salud pública debido a su potencial transmisión zoonótica a los humanos (95).

El virus de Influenza aviar H5N1, ha experimentado una evolución molecular significativa a lo largo del tiempo. Entre los virus de la influenza aviar, el HPAIV del subtipo H5 descendiente del virus A/H5N1, detectado por primera vez en China en 1996, pertenece al linaje A/goose/Guangdong/1996. El gen de la hemaglutinina de los virus H5 del linaje A/goose/Guangdong/1996 evolucionó en múltiples clados filogenéticos que han causado brotes en aves de corral y aves silvestres en todo el mundo (95, 96).

Desde su primer brote en Hong Kong en 1997, el virus H5N1 se ha diversificado en diferentes clados. Uno de los primeros clados genéticos identificados fue el clado 0, asociado a brotes en Asia. Este clado mostró una alta virulencia en humanos ocasionando una alta tasa de mortalidad. A medida que el virus se propagaba a diferentes regiones, se identificaron nuevos clados. Por ejemplo, el clado 1 se encontró en Vietnam y Tailandia, y mostró mayor capacidad de transmisión entre humanos en comparación con el clado 0 (97).

Durante el año 2003 reapareció el virus en China y en otros países causó brotes generalizados en aves de corral en toda Asia. En el 2005, aves silvestres propagaron el virus al Oriente Medio, África y Europa. Entre el 2014 y 2016 se produjo un intercambio de genes de los virus H5 de aves de corral y silvestres originando los subtipos H5N6 y H5N8. La HA se diversificó en el clado 2.3.4.4 en Asia, África, Europa, Oriente Medio y América del Norte. (Figura 12) (96, 97).

Los eventos de transmisión repetidos de las aves de corral a las poblaciones de aves silvestres migratorias en Asia permitieron que estos virus se propagaran por Eurasia, África y América del Norte. (96)

Desde 2020, los brotes causados por el clado 2.3.4.4b de Influenza A/H5N1 se han informado en muchos países de Europa, Asia, África y América del Norte. (98). Este clado es motivo de gran preocupación debido a su capacidad de redistribución, eficacia de transmisión en aves y capacidad de transmisión entre especies que infectan a nuevos huéspedes, incluidos humanos y otros mamíferos.

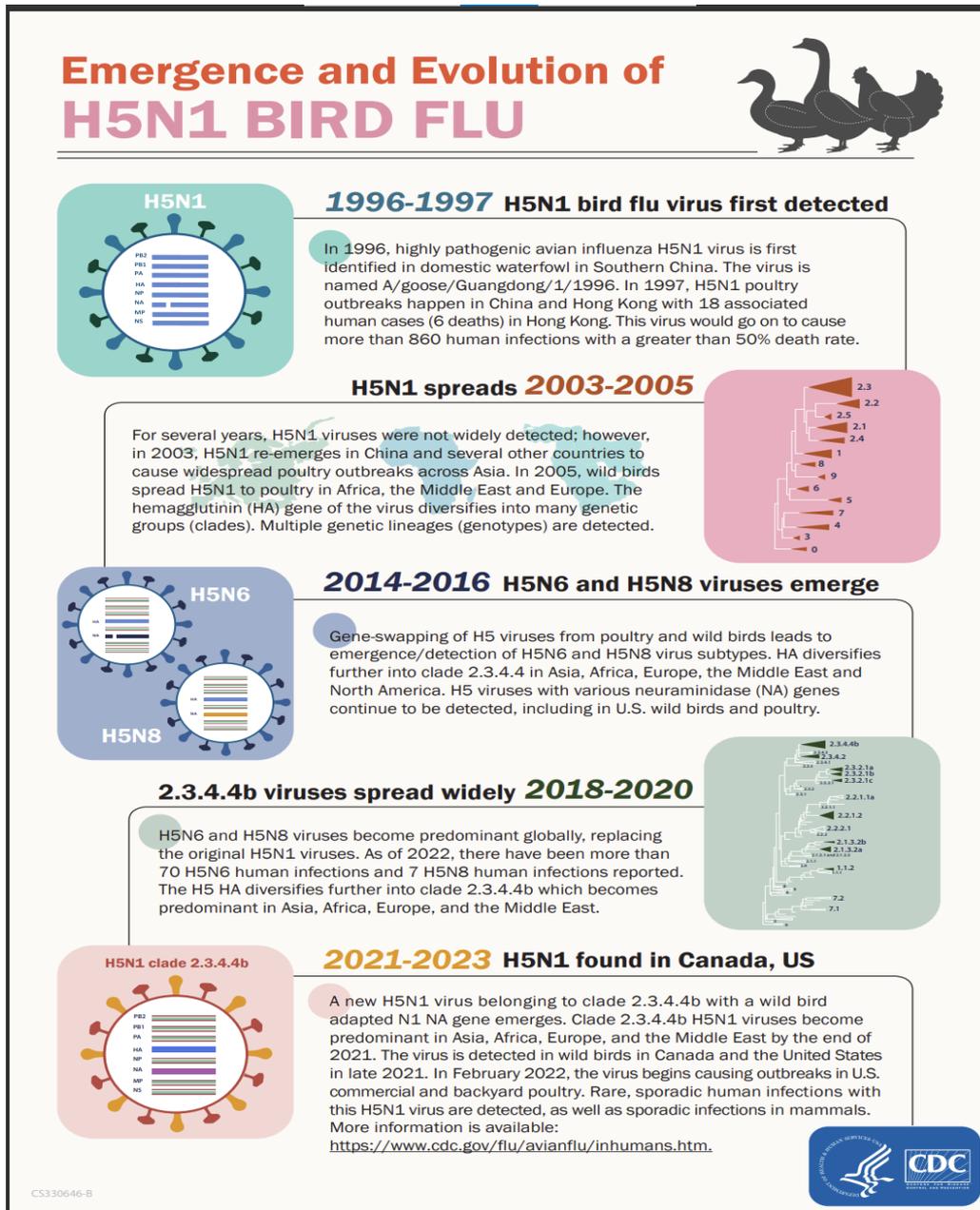


Figura 12. Emergencia y evolución de la gripe aviar H5N1. Se puede visualizar los principales brotes que ha producido el virus a través del tiempo, desde los primeros casos detectados en 1996 hasta el 2023 (97).

Desde el mes de febrero del 2022 se ha presentado un brote de A/H5N1 del clado 2.3.4.4b en los Estados Unidos. Este clado ha causado un impacto sin precedentes en las aves de corral y aves silvestres. Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), ya se han reportado más de 53 millones de cabezas de aves de corral infectadas y más de 4.000 casos en aves silvestres (99).

Además, en abril de 2022, se notificó un caso de infección de ave de corral a humanos en Colorado EEUU. Después de que el virus se propagó en América del Norte, se detectaron nuevos brotes de A/H5N1 en aves de corral y silvestres en México y, más recientemente, en Colombia, Perú y Venezuela a finales de 2022 y en Chile, Argentina y Uruguay en 2023. En Colombia el brote fue reportado en aves de corral y actualmente está afectando a 35 localidades en la costa norte del Caribe (99).

En Perú, el brote se reportó en pelícanos salvajes en el norte del departamento de Piura en la frontera en Ecuador, y se está extendiendo hacia el sur y actualmente afecta a las poblaciones de pelícanos en los departamentos de Lambayeque y Lima. En Venezuela, el brote también se notificó en pelícanos salvajes en el estado de Anzoátegui. En Chile, el brote está afectando a aves silvestres, como pelícanos, gaviotas grises o rayas negras (las secuencias virales se cargaron en la base de datos de Global Influenza Surveillance AID (GISAID) de Perú, Venezuela y Chile (100).

Con respecto a los brotes de Influenza aviar de alta patogenicidad A/H5N1 en países vecinos, la agencia reguladora de salud en Ecuador (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – Agrocalidad, Ministerio de Agricultura y Ganadería) reforzó el programa nacional de vigilancia de gripe aviar. Una mortalidad inusual en una granja avícola en la provincia de Cotopaxi (región andina de Ecuador) generó preocupación, y se recolectaron muestras para la detección de la gripe H5 mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (qRT-PCR) (100).

Para el 24 de noviembre de 2022, se declaró un brote de gripe aviar H5. Hasta febrero de 2023, más de 1,1 millones de animales fueron afectados en dos granjas avícolas (pollos) diferentes en las provincias de Cotopaxi (noviembre

de 2022) y Tungurahua (enero de 2023). En 2023 se reportaron más casos de aves domésticas (pollo) en las provincias de Bolívar, Tungurahua y Pichincha (101).

El clado A/H5N1 2.3.4.4b, se incluyó recientemente en la lista de virus candidatos a vacuna contra la Influenza zoonótica de la Organización Mundial de la Salud (102).

2.2.5. Importancia de la problemática a abordar

Las enfermedades infecciosas, en particular las causadas por virus respiratorios que provocan infecciones respiratorias agudas graves, constituyen un desafío significativo para la salud pública a nivel mundial. El virus de la Influenza es uno de los principales virus respiratorios que tiene un alto potencial pandémico y epidémico (4).

Este potencial se ve reforzado por la creciente detección de brotes de Influenza aviar altamente patogénica en aves registrados en varios países, así como la confirmación de infecciones humanas y en mamíferos causadas por el virus de Influenza A(H5N1) en América latina y el Caribe (103).

El virus de influenza posee una notable capacidad biológica para reordenarse genéticamente, lo que puede alterar su nivel de letalidad, transmisibilidad o el rango de huéspedes susceptibles. Estos cambios pueden ocurrir en toda su estructura genética, pero las dos glicoproteínas de superficie del virus, la hemaglutinina y la neuraminidasa, son de particular interés para los sistemas de vigilancia genómica en los países (8).

La hemaglutinina de los virus de Influenza contiene sitios antigénicos que son reconocidos por el sistema inmunológico del huésped, sitios de escisión cortados por proteasas, sitios de unión al receptor que reconocen los receptores de ácido siálico en la membrana celular y péptidos que median la fusión durante el ingreso del virus a la célula. Esto hace importante el estudio a nivel molecular de la región de la HA con fines de salud pública (1).

Por otro lado, la neuraminidasa es una proteína esencial en el ciclo de replicación del virus de la Influenza, ya que facilita la liberación del virus de las

células huésped y su posterior propagación. El estudio de la neuraminidasa es crucial para la identificación del marcador H275Y, que se asocia a la resistencia del oseltamivir, un fármaco antiviral ampliamente utilizado en los sistemas de vigilancia y tratamiento para la enfermedad (57).

Dado estos conceptos, los cambios o mutaciones específicas en estas glicoproteínas, con énfasis en los principales sitios antigénicos conocidos, pueden incidir en las estrategias terapéuticas del virus, el potencial de infección viral, los mecanismos de evasión en la respuesta inmune natural o adquirida, así como la propagación entre huéspedes.

En este contexto, la vigilancia genómica de la Influenza, que implica el seguimiento y análisis de las secuencias genéticas del virus de la influenza para entender su evolución y propagación, se vuelve crucial. Este proceso es fundamental para aportar al conocimiento y comportamiento del virus frente a amenazas como las pandemias.

Con el fin de mitigar el impacto del virus a nivel global, la OMS realiza reuniones bianuales para la elaboración de la vacuna. Sin embargo, las formulaciones de las vacunas de Influenza se encuentran principalmente basadas en la información obtenida a partir de los países templados del hemisferio norte y sur, donde reside el 57 % y el 2 % de la población mundial. Esto representa un desafío, dado que existe una relativa escasez de datos procedente de los países tropicales, lugares donde habita el 41 % de la población (14 – 16, 36).

Es fundamental estudiar los patrones espaciales y temporales del virus de la Influenza, es fundamental para un control eficiente de la enfermedad y establecer programas de vacunación eficientes. Sin embargo, los patrones espaciotemporales de propagación, así como la circulación de genotipos de los virus de Influenza a escala nacional, no se han determinado claramente para muchas regiones tropicales del mundo (35).

Tomando como referencia a Ecuador, un país tropical que presenta dos períodos de circulación viral, comprendidos entre los meses de diciembre – enero y un pico secundario durante los meses de julio – agosto, es importante

considerar diversos factores. La ubicación geográfica del país en la línea ecuatorial determina las influencias climatológicas del hemisferio norte y del hemisferio sur; las características biológicas propias del virus; y características ambientales, como la humedad, precipitación, altitud, entre otras, pueden incidir en el comportamiento epidemiológico del virus (14 – 16).

En este sentido comprender la variabilidad genética y la estacionalidad de los virus de Influenza, es crucial en términos de prevención y control. Esta información es crucial para la toma de decisiones por parte de las autoridades sanitarias de los países en lo referente a decidir cuál es el período óptimo para la vacunación en países tropicales. Sin embargo, esta información es en general limitada y dificulta la implementación de políticas sanitarias adecuadas considerando las características biológicas del virus, así como la comparación de la cepa vacunal frente a los grupos genéticos que se identifiquen.

Por lo anteriormente mencionado, la relación entre la vacuna, los genotipos circulantes y su temporalidad, se puede realizar mediante la aplicación de tecnologías como el uso de herramientas bioinformáticas cada vez más eficientes, a menor costo. Varias de estas herramientas se encuentran disponibles de manera on-line para realizar análisis automatizados, listos para ser utilizados y pueden colaborar con los sistemas de salud que buscan alternativas más eficaces para mitigar la enfermedad y poder responder a preguntas biológicas (104).

Por otro lado, es importante considerar el impacto de los virus de Influenza en poblaciones de aves, como el H5N1, que pueden tener implicaciones significativas tanto para salud humana como para la salud animal debido a su potencial transmisión zoonótica.

En este sentido esta investigación contribuirá a determinar los genotipos circulantes de los virus de Influenza en el Ecuador tanto en humanos como en aves, así como analizar su variabilidad genética. Además, permitirá evaluar cuán relacionados están los virus de la influenza circulantes en un país tropical contra las cepas utilizadas de referencia para la formulación anual de la vacuna.

El análisis de este tipo de información integral con enfoque una salud, complementará los datos virológicos existentes y aportará al sistema nacional de vigilancia destinada al diseño de políticas sanitarias por parte de las Autoridades Nacionales de Salud en el manejo y control de esta infección con base a evidencia científica. Esto resalta la importancia de mantener una vigilancia constante y fomentar investigaciones continuas en este campo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la variabilidad genética, evolución molecular y estacionalidad de los virus de Influenza en Ecuador y comparar con las cepas vacunales recomendadas para ambos hemisferios.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Analizar los tipos/subtipos circulantes de Influenza a partir de los resultados confirmados por laboratorio de la vigilancia de Infecciones Respiratorias Agudas Graves.

3.2.2. Determinar la estacionalidad y la temporalidad del virus de Influenza en el Ecuador.

3.2.3. Analizar la variabilidad genética del gen de la hemaglutinina de los virus de la Influenza A/H1N1 pdm09, H3N2 e Influenza B que han circulado en el Ecuador.

3.2.4. Determinar la evolución molecular y la relación filogenética de las cepas circulantes en Ecuador con respecto a las cepas vacunales recomendadas por la OMS.

3.2.5. Investigar la presencia del marcador molecular H275Y.

4. MATERIALES Y METODOS:

4.1. Diseño:

Retrospectivo, Descriptivo.

4.2. Universo:

El presente trabajo utilizó información reportada en la plataforma *Flunet* (105) a partir de muestras de hisopados nasales de pacientes que presentaron una infección respiratoria aguda grave. Estas muestras fueron recibidas en el Centro Nacional de Influenza de Ecuador, durante los períodos 2011 – 2021 para Influenza A y del 2012 al 2023 para Influenza B.

El centro de referencia internacional CDC de Atlanta, realizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación con un panel de antisueros de hurón para realizar la caracterización antigénica de las regiones hemaglutinina y neuraminidasa.

Para los estudios de estacionalidad y temporalidad para los tipos de Influenza, se analizaron un total de 4038 datos para Influenza A y 532 para Influenza B; en cuanto a los subtipos, se analizaron 1861 datos de A/H1N1 pdm09 y 1480 para A/H3N2.

En lo referente a los análisis genéticos se utilizaron 67 secuencias de A/H1N1 pdm09, 46 secuencias de A/H3N2 y 44 secuencias de Influenza B. Las secuencias genéticas fueron obtenidas de la base pública GISAID (106).

4.3. Extracción de ARN:

La extracción del ARN se realizó utilizando el kit comercial QIAmp® Viral RNA Mini kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos obtenidos de extracciones se almacenaron a - 20°C y - 70°C.

4.4. Amplificación Molecular para los virus de Influenza:

Se utilizó la región de la hemaglutinina, acorde a lo recomendado en el protocolo del CDC de Atlanta para la detección y caracterización del virus de Influenza para los Centros Nacionales de Influenza (107), la enzima utilizada

fue de la marca Invitrogen, *OneStep*, los iniciadores y sondas fueron obtenidos a partir del kit distribuido por el CDC de Atlanta, EEUU, de acuerdo a las instrucciones dadas por los proveedores.

Las muestras fueron analizadas con el juego de iniciadores y sondas para la región de la matriz (M1) para la detección de Influenza A y la región NS2 para el virus de Influenza tipo B; la región de la hemaglutinina fue utilizada para la identificación de los subtipos H1, H3, B/Victoria, B/Yamagata y H5 (107).

Condiciones de ciclado: La transcripción reversa fue realizada a una temperatura de 50°C por 30 min, seguido de un proceso para la inactivación del inhibidor de la taq polimerasa de 95°C por 2 min y una amplificación de PCR de 45 ciclos con dos pasos de 95°C por 15 segundos y 55°C por 30 segundos, respectivamente. En este último paso se colectaron los datos de fluorescencia en FAM (107).

4.5. Secuenciación:

Las muestras fueron enviadas al equipo de secuenciación de Influenza del CDC de Atlanta y las secuencias de la región de la hemaglutinina y de la neuraminidasa fueron obtenidas a partir de la plataforma pública de datos genéticos de Influenza GISAID. (106)

4.6. Visión espacial, temporal y evolutiva del virus de Influenza en Ecuador.

Para extraer y visualizar los parámetros de series temporales epidemiológicas, se empleó la herramienta EPIPOI (108). Este enfoque de análisis de series temporales, permite estudiar tendencias a largo plazo, estacionalidad y anomalías, como, por ejemplo, cifras de mortalidad en epidemias particularmente graves en comparación con las cifras esperadas en función de la tendencia y la variación estacional e interanual regular en los años circundantes. También permite trazar y analizar espacialmente todos los parámetros que describen los componentes de las series temporales de diferentes ubicaciones. Por ejemplo, permite mostrar si el aumento del pico anual de una enfermedad cambia a lo largo de un gradiente latitudinal.

Esta herramienta se empleó con los datos publicados en la plataforma de OPS *Flunet*. A partir de estos datos, se estimaron los picos primarios y secundarios epidémicos de las estaciones de Influenza en el Ecuador. Estos picos pueden definirse como el primer y segundo aumento de casos de la temporada de Influenza (108).

Se llevó a cabo un análisis del número total de casos positivos de Influenza A por mes, desde enero del 2011 hasta diciembre del 2021, sumando un total de 4038 casos. Además, se recopilaron 532 datos de Influenza B desde 2012 hasta la semana epidemiológica 27 del 2023. Los datos proceden de seis regiones geográficas de Ecuador: Guayas, Pichincha, Chimborazo, Azuay, Cañar e Imbabura, tal como se muestra en la Figura 13.

La función periódica anual (PAF por sus siglas en inglés) de la serie de tiempo epidemiológica, se obtuvo después de deshacer la tendencia con un polinomio cuadrático y sumar los armónicos anuales, semestrales, y trimestrales obtenidos por descomposición de Fourier.

Posteriormente, se estimó el momento y la amplitud del pico primario anual de los períodos de tiempos estudiados para Influenza A - B y para cada ubicación ecuatoriana estudiada. El momento del pico primario anual es cuando se detecta la máxima intensidad anual de actividad de los virus de Influenza, mientras que la amplitud máxima es equivalente a la fuerza del ciclo epidémico. Se analizaron estos parámetros en función de la latitud de cada ubicación.

Para cada una de las 6 provincias de Ecuador estudiadas, se recopilaron la temperatura media mensual en grados centígrados (°C), la humedad relativa (%) y la precipitación media (mm) a partir de Climate-Data.org (disponible en: www.es.climate-data.org). La correlación entre variables ambientales, se estableció mediante la prueba de correlación producto momento de Pearson (109).

4.6.1. Análisis de Secuencias.

En lo que respecta a los análisis filogenéticos, se utilizaron secuencias completas del gen de la hemaglutinina de la Influenza A/H1N1 pdm09 reportadas entre 2013 y 2020; para el subtipo A/H3N2 entre 2015 – 2022 y para los virus de Influenza B entre 2015 - 2023.

Las secuencias vacunales de referencia y las secuencias del virus circulante en Ecuador, se obtuvieron a partir de la plataforma pública GISAID; el alineamiento se realizó mediante el uso de software especializados para el análisis de secuencias como: BIOEDIT, MAFFT versión 7. Inicialmente, se utilizó el programa BIOEDIT para construir la base de datos de las secuencias disponibles de Ecuador, y el alineamiento final para la construcción de los árboles filogenéticos fue realizado con el programa MAFFT versión 7 (110 - 112).

Para reconstruir la historia evolutiva de las cepas de Influenza A que circulan en Ecuador, se utilizó un enfoque Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) usando el modelo de nucleótidos HKY+. Se empleó un reloj molecular relajado y un método de aproximación coalescente estructurada mediante la integración de todos los posibles historiales de migración de la región de la hemaglutinina usando MASCOT v2.1.2 (113) implementado en el paquete BEAST v2.5.2 (114).

A diferencia de otras aproximaciones que tratan el movimiento de un linaje completamente independiente de todos los demás linajes, este enfoque incluye explícitamente información sobre la ubicación de otros linajes y su probabilidad de unirse al modelar el movimiento de un linaje.

Inicialmente, se determinó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba al conjunto de datos de secuencia mediante el programa W-IQ-TREE (115). Se utilizaron el criterio de información bayesiano (BIC), el criterio de información de Akaike (AIC) y el logaritmo de la verosimilitud (LnL) para identificar el mejor modelo. La incertidumbre estadística en los datos se reflejó en los valores de densidad de probabilidad más alta (HPD) del 95%. Los resultados se

examinaron utilizando el programa TRACER v.1.7.2 (disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) (116).

La convergencia se evaluó mediante tamaños de muestra efectivos (ESS) superiores a 200. Se generaron árboles de máxima credibilidad mediante el uso del programa Tree Annotator del paquete BEAST (117).

Este método proporciona un árbol filogenético que evalúa cada uno de los árboles posteriores muestreados, dando un árbol que resume los resultados de una inferencia de filogenia bayesiana. La visualización de los árboles filogenéticos se realizó utilizando FigTree v.1.4.4 (disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>) (118).

Los árboles filogenéticos de Influenza B se construyeron utilizando el método de Neighbor-Joining con Maximum Composite Likelihood como el modelo de sustitución de nucleótidos. Para este análisis inicial se utilizó el software MEGA versión XI. (119) Posteriormente, se construyó un Árbol de máxima verosimilitud realizado con el programa W-IQ-TREE bajo el modelo GTR+G4+F -alrt 20000000.

En cuanto a los análisis para determinar determinar los clados circulantes anualmente, se emplearon las herramientas Nextclade (120) y los gráficos de tipo mullerplot realizado con la herramienta R. (121, 122) Estos análisis y visualizaciones permiten una comprensión rápida y más profunda de la evolución y propagación de los virus de Influenza.

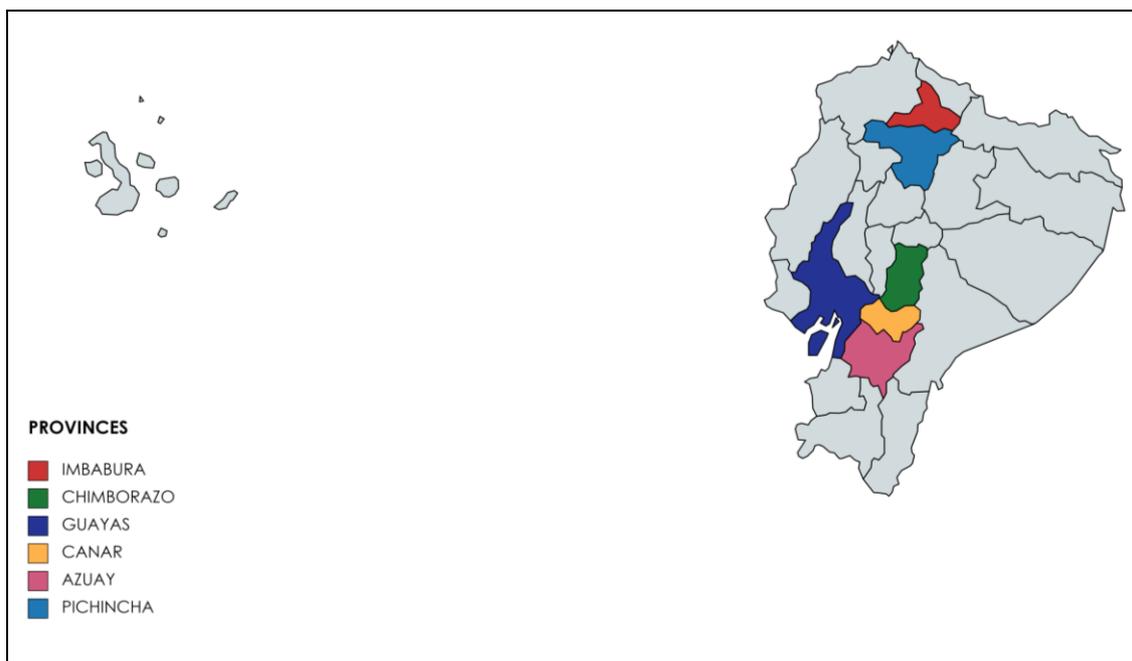


Figura 13. Mapa de las provincias analizadas en el estudio de temporalidad. Este mapa creado con la herramienta mapchart (<https://www.mapchart.net/americas-detailed.html>), muestra la ubicación geográfica de las provincias incluidas en el estudio. Cada provincia se representa con un color único para facilitar su identificación (17).

4.7. Análisis Filogenético de Influenza aviar H5N1.

Se analizaron 5 hisopos traqueales y cloacales de pollo H5 positivo (de la granja donde comenzó el brote en la provincia de Cotopaxi) que fueron enviadas al Centro Nacional de Influenza del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación y los resultados primarios de RT-PCR se confirmaron como A/H5N1, utilizando los cebadores remitidos por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC de Atlanta para la subtipificación de Influenza A/H5 (linaje asiático). Tres de estas muestras tenían valores de umbral de ct menor a 30 y fueron seleccionados para realizar la secuenciación de genoma completo (100).

Las muestras de A/H5N1 seleccionadas para la secuenciación del genoma completo fueron depositadas en GISAID (EPI_ISL_16157545, EPI_ISL_16161673 y EPI_ISL_16161675). Se realizó una alineación por pares de la región de la neuraminidasa con la herramienta de búsqueda de alineación local básica, BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (123), con una homología de identidad de nucleótidos de 1401/1408 (99%). Para determinar el origen de las tres muestras virales, se creó una alineación del gen de la hemagglutinina

haciendo coincidir los tres aislamientos con las secuencias de referencia previamente determinadas utilizando el método de alineación MAFFT. El modelo Hasewa-Kishino-Yano se determinó como el mejor modelo ajustado para la alineación con el software jModelTest 2.1.10. El muestreo Bayesian Markov Chain Monte Carlo con BEAST versión 2.7.1 se ejecutó utilizando un reloj molecular estricto, con el Coalescent Bayesian Skyline con 10 millones de generaciones (100).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de temporalidad Influenza en Ecuador

Se analizaron el número total de casos positivos de Influenza A/H1N1 y A/H3N2, dejando por fuera los casos de Influenza A no subtipificables, el año pandémico 2020, el período del análisis para ambos subtipos fue desde 2012 hasta el 2022, para un total de 1861 casos de A/H1N1 pdm09 y 1480 casos para A/H3N2, a partir de seis regiones geográficas diferentes de Ecuador que presentaron datos durante todo el período de estudio.

5.1.1. Temporalidad de Influenza A/H1N1 pdm09 y A/H3N2

Como se puede observar en las Figuras 14 y 15, los picos primarios mensuales se establecieron en enero para todas las regiones ecuatorianas estudiadas. El análisis presentado revela una periodicidad anual o estacionalidad bien definida que se asemeja a la estacionalidad encontrada para los países templados del hemisferio norte, los cuales se encuentran caracterizados por picos epidémicos en la temporada de invierno de ese hemisferio.

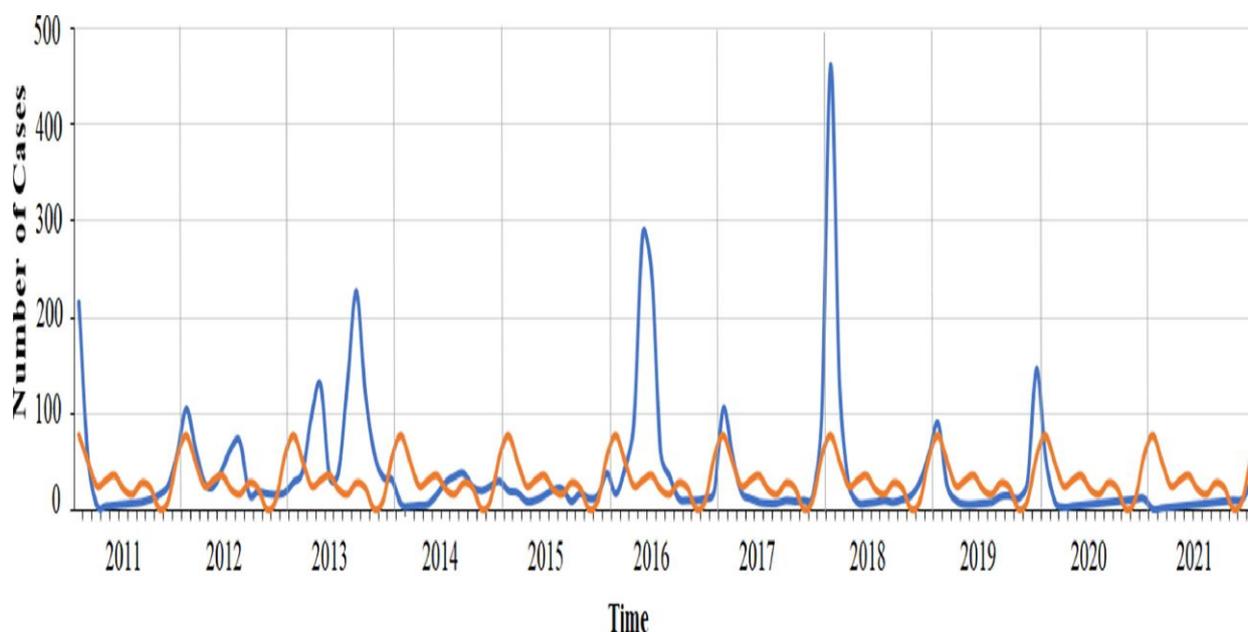


Figura 14. Estacionalidad de Influenza A en Ecuador 2011-2021. La función periódica anual es obtenida al sumar los armónicos de 12 meses, 6 meses y 3 meses se muestra en naranja y representa los patrones o tendencias estacionales de Influenza esperadas en cada período de tiempo. La serie temporal original se muestra en color azul.

En la Figura 15, se observan picos secundarios mensuales durante el mes de mayo para las provincias ubicadas al norte y centro del Ecuador (Pichincha, Imbabura y Chimborazo), mientras que picos secundarios mensuales para provincias del sur como Guayas y Azuay, se observaron en agosto y septiembre y Cañar entre junio - julio.

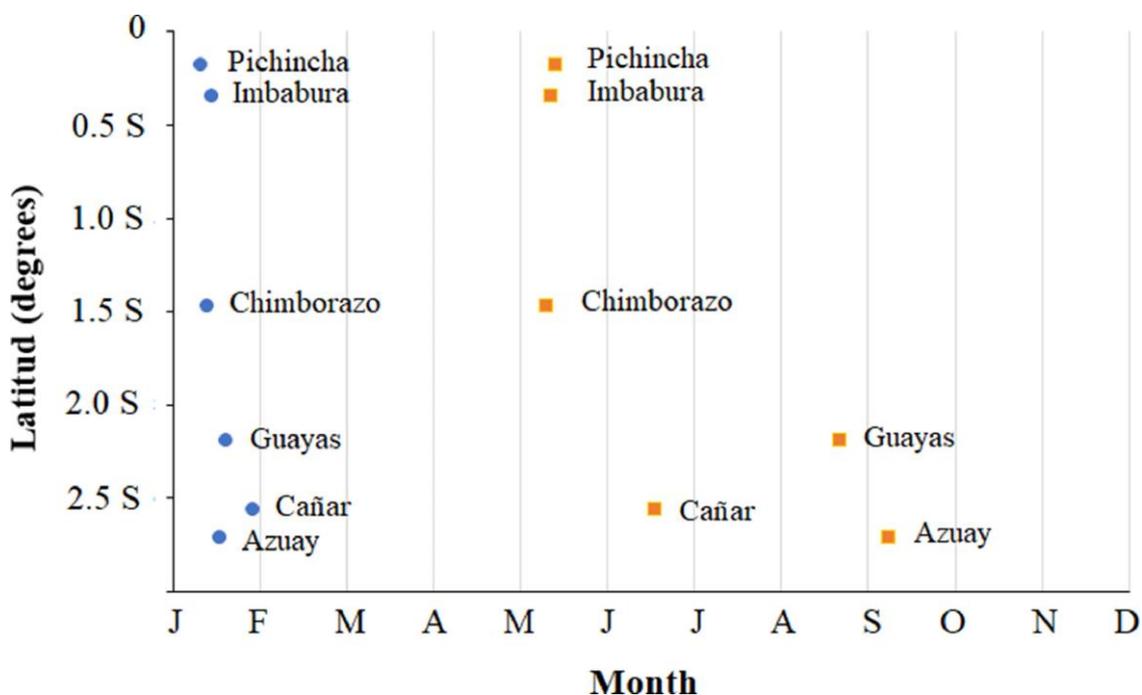


Figura 15. Momento de los picos primarios y secundarios mensuales de Influenza A en seis provincias ecuatorianas diferentes; se muestra el momento del pico primario (círculos azules) y secundario (cuadrados naranjas) frente a la posición latitudinal de cada provincia.

Se calculó la amplitud de los picos primarios y secundarios mediante el análisis de la serie temporal. Se encontraron amplitudes similares para los picos primarios en todas las ubicaciones geográficas estudiadas. En el caso de las amplitudes encontradas para los picos secundarios, se encontraron diferencias significativas (>30%) para las provincias del Guayas en comparación con las provincias estudiadas (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de series de tiempo encontrados en los estudios de estacionalidad de Influenza A en Ecuador.

Provincia	Latitud Amplitud	Longitud Amplitud	Mes Pico primario	Mes Pico secundario
Pichincha	0.1807S 104.146	78.4678 W 63.420	1.326	5.416
Imbabura	0.3500S 45.658	78.1167 W 95.100	1.453	5.366
Chimborazo	1.4695 45.290	78.8168 W 98.427	1.403	5.303
Guayas	2,1961 106.332	79.8862 W 80.530	1.623	8.676
Cañar	2.5606S 90.483	78.9394W 51.266	1.926	6.556
Azuay	2.7138S 93.197	78.8892 W 12.002	1.550	9.243

Con el fin de observar si los factores climáticos pueden estar relacionados con la estacionalidad observada, se establecieron los promedios mensuales de temperatura (°C), precipitación (mm) y humedad (%) para todas las localidades geográficas estudiadas. La figura 16 muestra la variación anual de parámetros climatológicos en las distintas provincias. El pico primario de infecciones por Influenza A ocurre durante períodos de alta precipitación y humedad (Fig. 16 y 17). Curiosamente, se encontraron diferencias significativas en las temperaturas medias mensuales entre Guayas y el resto de las localidades estudiadas (Fig. 16 A). Esto se relaciona con el hecho de que Guayas se encuentra ubicado a nivel del mar con un clima tropical, mientras que el resto de provincias se encuentran a gran altura.

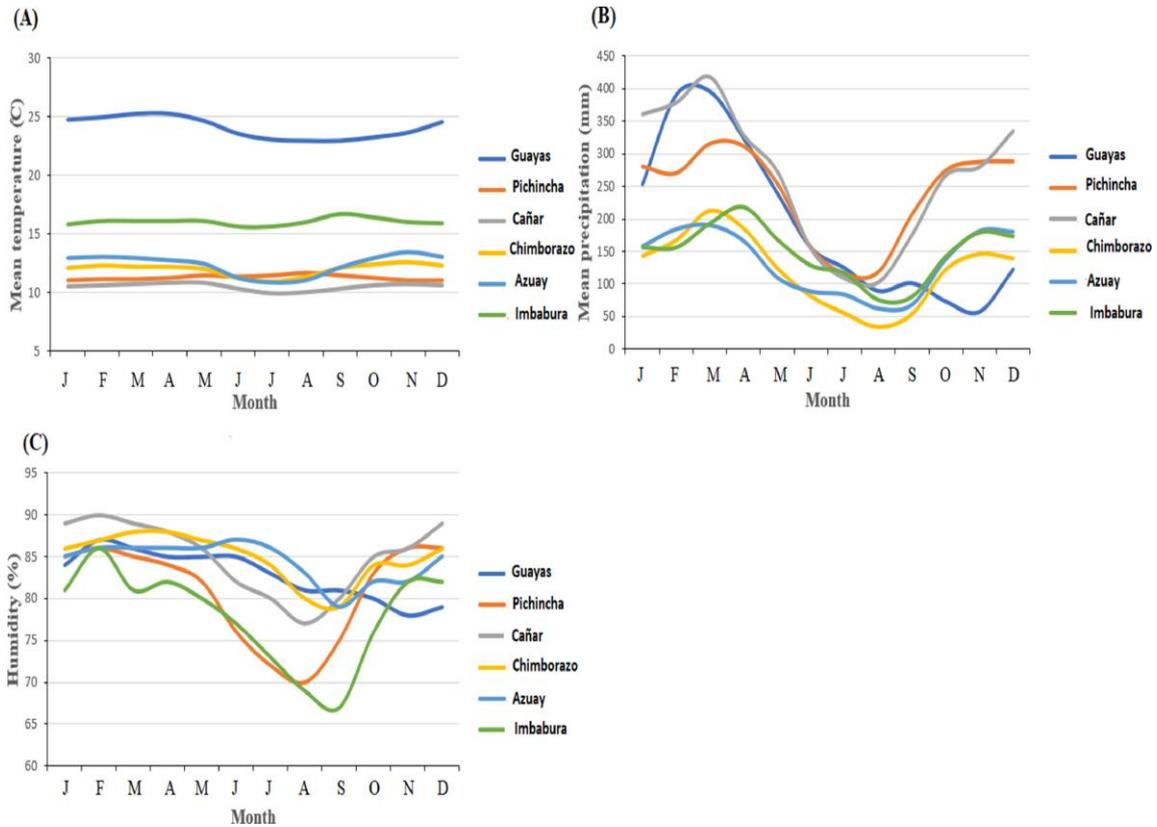


Figura 16. Parámetros climáticos de las provincias ecuatorianas. Las temperaturas medias mensuales, precipitación y humedad en diferentes provincias ecuatorianas se muestran en A, B y C, respectivamente. Los colores asignados a cada provincia se indican a la derecha de cada gráfico.

En la Figura 17, se puede observar que la mayor cantidad de casos positivos para Influenza AH1N1 pdm09 durante el período de estudio fueron durante los primeros meses del 2018, seguido de un menor pico presentado en el año 2013.

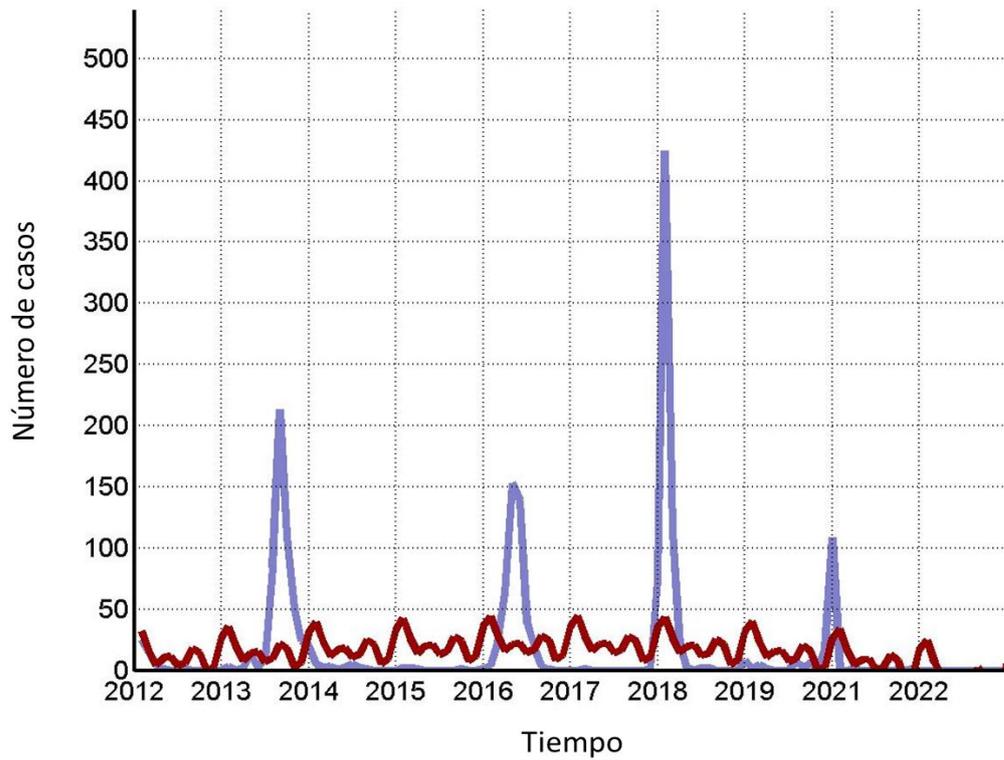


Figura 17. Estacionalidad de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador; 2012 - 2022. Sobre el eje de las X se observa el tiempo de manera anual en un período 2012 al 2022 y en el eje de las Y detalla el número de casos positivos. De color rojo se muestra la función periódica anual. La serie temporal original se muestra en color lila.

En lo referente al subtipo A/H1N1 pdm09, presentó la mayor cantidad de casos en el mes de enero, seguido de los meses de diciembre y agosto, lo cual se encuentra representado por un gráfico de barras en la Figura 18.

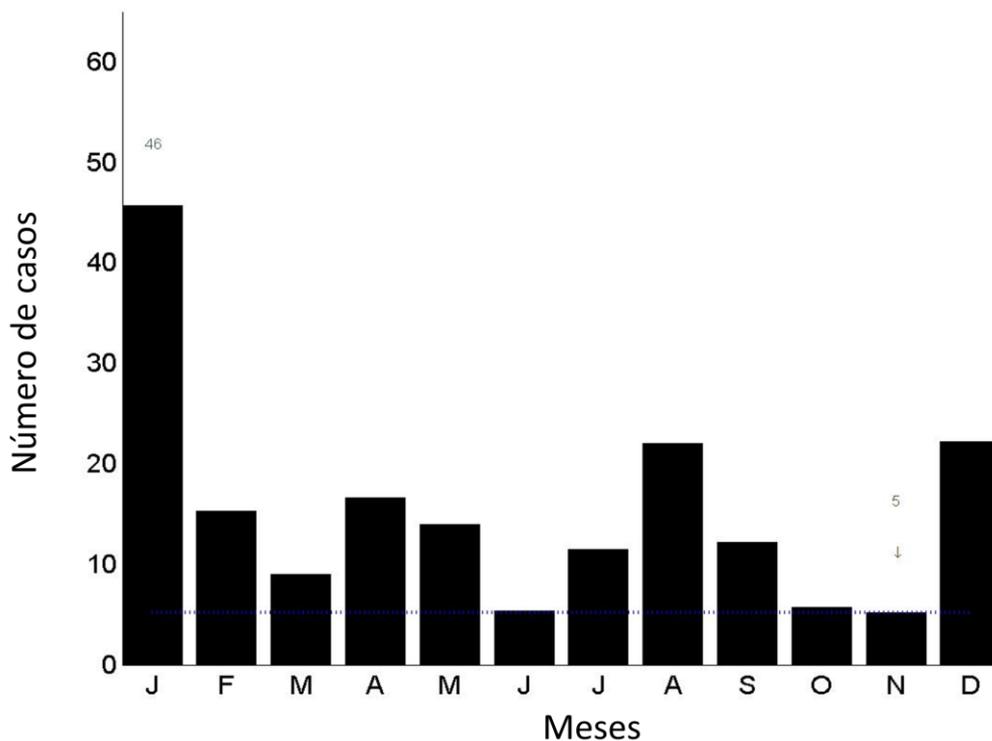


Figura 18. Estacionalidad mensual de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador; 2012 - 2022. El gráfico muestra la distribución mensual de los casos positivos de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador. El eje X representa los meses del año con su inicial en inglés, mientras que el eje Y indica el número de los casos positivos identificados cada mes. Los números 46 y 5 ubicados sobre las barras correspondientes a los meses de enero y noviembre, representan la cantidad de casos registrados en los meses con la mayor y menor cantidad de casos, respectivamente.

La Figura 19 evidencia los picos primarios para el subtipo A/H1N1 pdm09, en el cual, se puede observar que las provincias de Pichincha, Imbabura y Azuay es presentado en el mes de enero, Cañar lo presenta en el mes de julio, mientras que Chimborazo y Guayas presentan su pico primario en el mes de agosto.

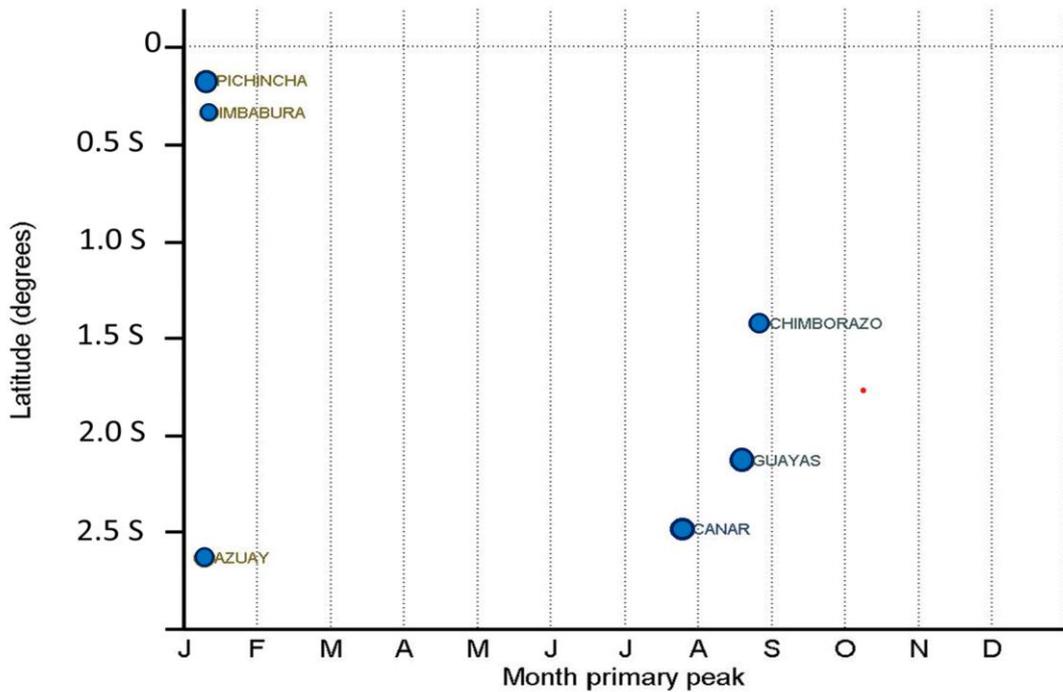


Figura 19. Análisis de pico epidémico primario de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador; 2012 - 2022. Cada círculo y su respectivo diámetro representa la proporción del número de casos positivos identificados; El eje X muestra las iniciales de los meses del año en inglés, mientras que el eje de las Y representa el grado de latitud para que se encuentran ubicadas las provincias estudiadas.

En la Figura 20 se puede observar el mes del pico secundario para los casos de Influenza A/H1N1 pdm09; las provincias de Chimborazo y Guayas lo presentan durante el mes de enero; Pichincha, Imbabura y Azuay durante el mes de mayo, mientras que la provincia de Cañar presenta su pico secundario en el mes de diciembre.

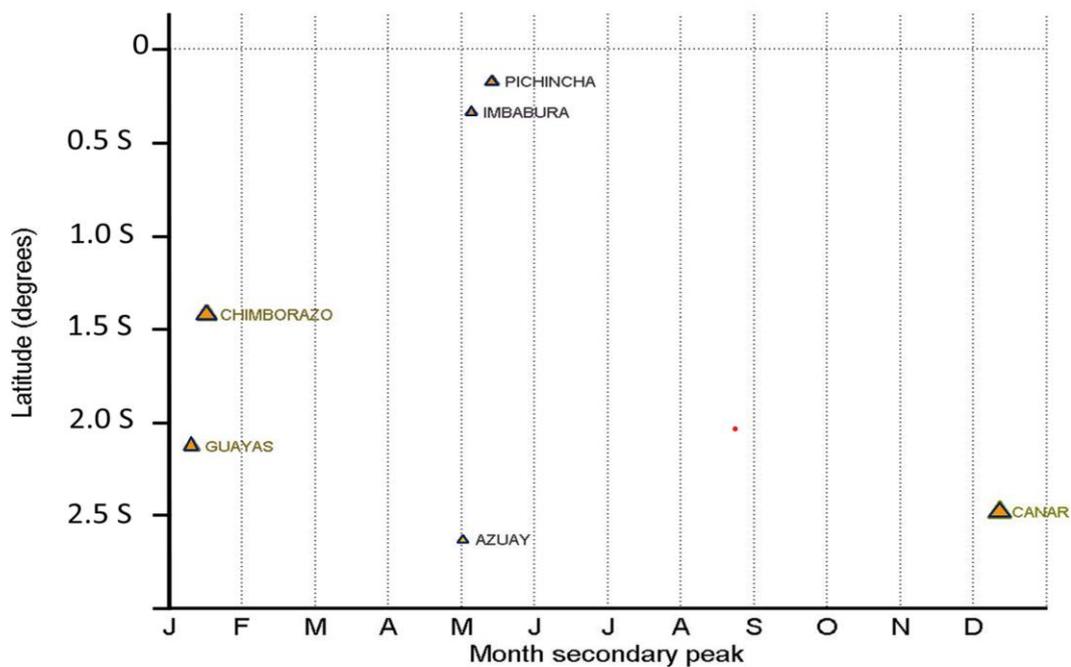


Figura 20. Análisis de pico epidémico secundario de Influenza A/H1N1 pdm09 en Ecuador; 2012 - 2022. Los triángulos representan el número de casos, con su tamaño proporcional al número de casos obtenidos. El eje X representa los meses del año con su letra inicial en inglés, indicando cuando ocurrieron los picos de la epidemia. El Y representa el grado de latitud que se utiliza para referenciar la ubicación de las provincias estudiadas.

Luego de realizar el análisis con la función periódica anual, se observa en la Figura 21, un patrón estacional para el subtipo A/H3N2 (color rojo). Este patrón muestra una tendencia de picos de circulación a inicios de cada año, lo cual coincide con el número casos positivos confirmados por laboratorio (color lila). Cabe destacar que el brote más significativo se presentó durante el año 2019.

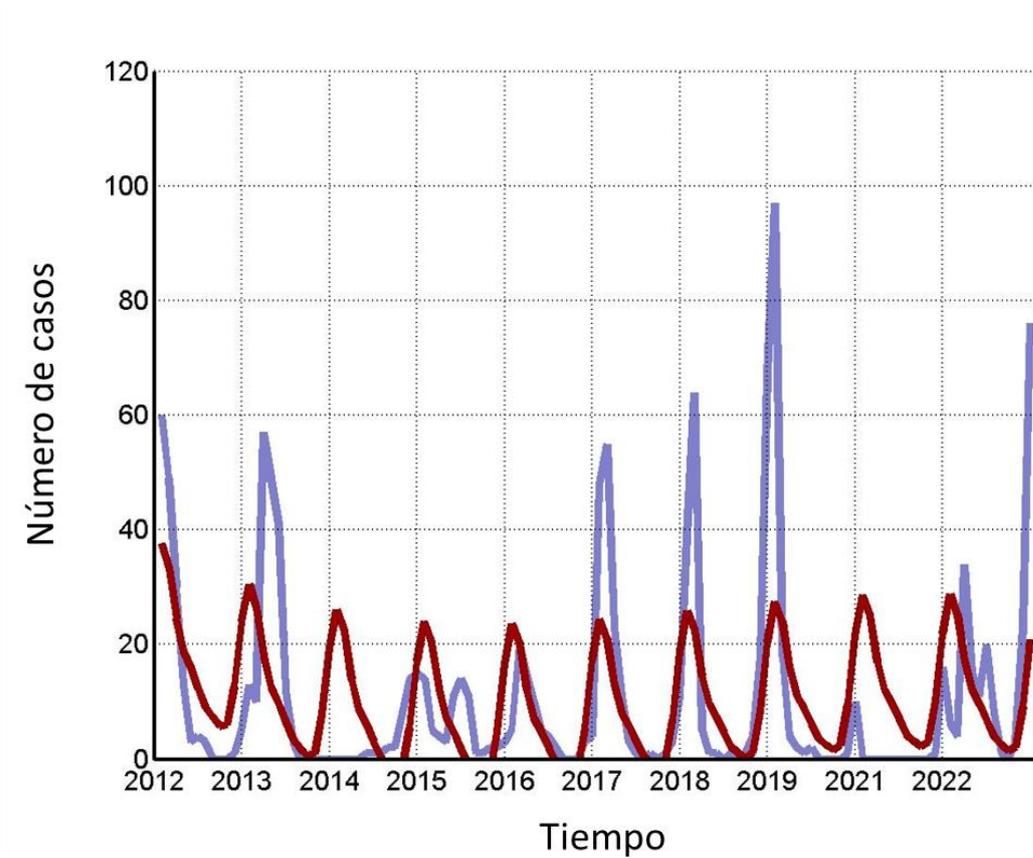


Figura 21. Estacionalidad de Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022. La función periódica anual se muestra en rojo; la serie temporal original se muestra en lila. Sobre el eje de las X se presenta el rango de número de casos y sobre el eje de las Y el período de tiempo anual.

La Figura 22 ilustra los meses en los que se observa una mayor circulación del subtipo A/H3N2. Se puede apreciar que enero es el mes que presenta la mayor cantidad de casos cada año, seguido de diciembre y febrero. En contraste, los meses de agosto y septiembre registraron la menor cantidad de casos.

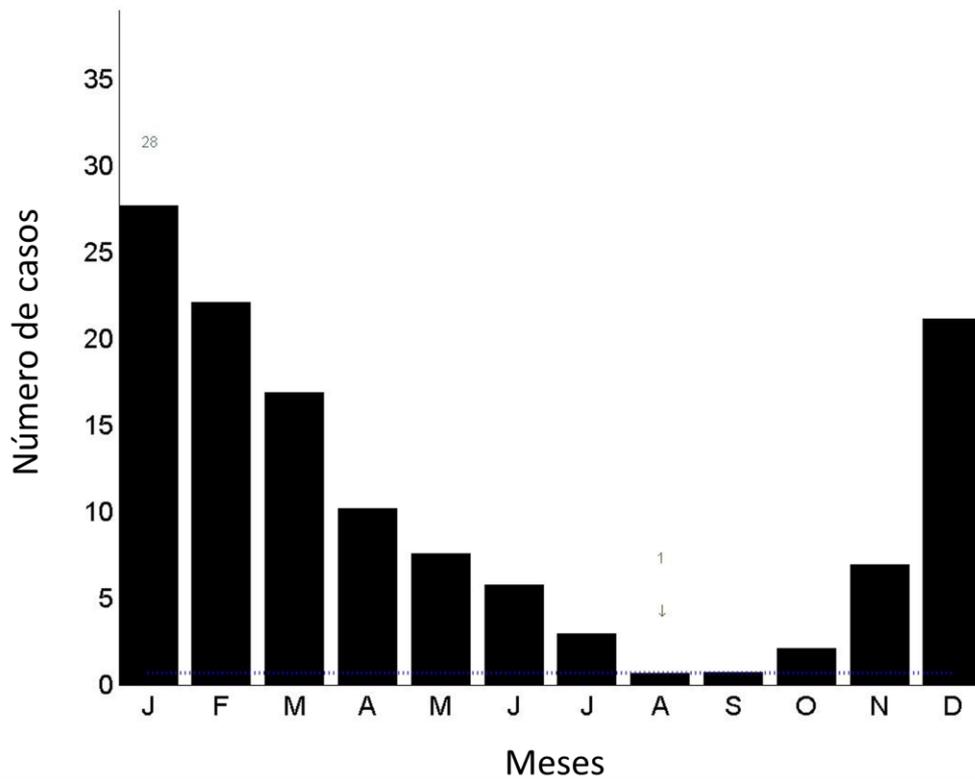


Figura 22. Estacionalidad mensual de Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022. El gráfico muestra la distribución mensual de los casos positivos de Influenza A/H3N2 en Ecuador. El eje X representa los meses del año, mientras que el eje Y indica el número de los casos positivos identificados cada mes. Los números 28 y 1 ubicados sobre las barras correspondientes a los meses de enero y agosto, representan la cantidad de casos registrados en los meses con la mayor y menor cantidad de casos, respectivamente.

La Figura 23 ilustra los picos primarios para el subtipo A/H3N2 en las provincias de estudio. Se observa que la provincia de Pichincha presenta su pico primario en enero; Cañar en febrero; Guayas en marzo y Chimborazo en abril; Por otro lado, las provincias de Imbabura y Azuay muestran su pico primario en el mes de diciembre.

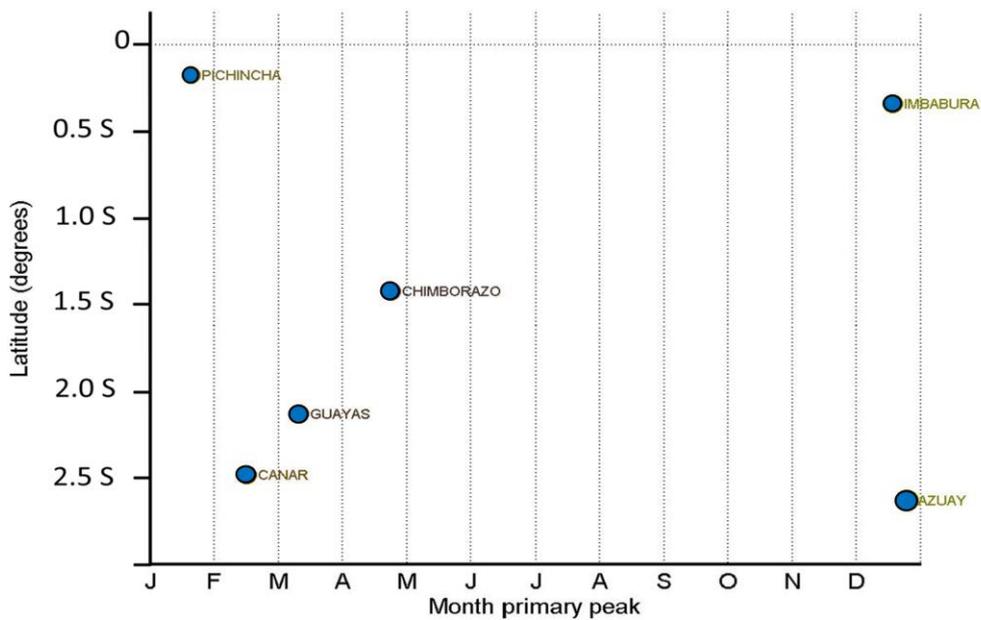


Figura 23. Análisis de pico epidémico primario, Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 – 2022. Cada círculo en el gráfico representa la proporción de casos positivos de Influenza A/H3N2, con su diámetro indicando la cantidad de casos. El eje X muestra los meses del año en inglés, mientras que el eje Y representa la latitud, proporcionando una referencia geográfica a las provincias estudiadas en Ecuador. Este análisis de pico primario proporciona una visión detallada de la prevalencia de la Influenza A/H3N2 en diferentes momentos y lugares del país.

De igual forma, la Figura 24 muestra los picos secundarios para el subtipo A/H3N2 en las provincias analizadas. Se observa que la provincia de Imbabura presenta su pico secundario en abril; Pichincha y Azuay en mayo; Cañar en Junio; Guayas en Julio; mientras que Chimborazo muestra su pico secundario en el mes de diciembre.

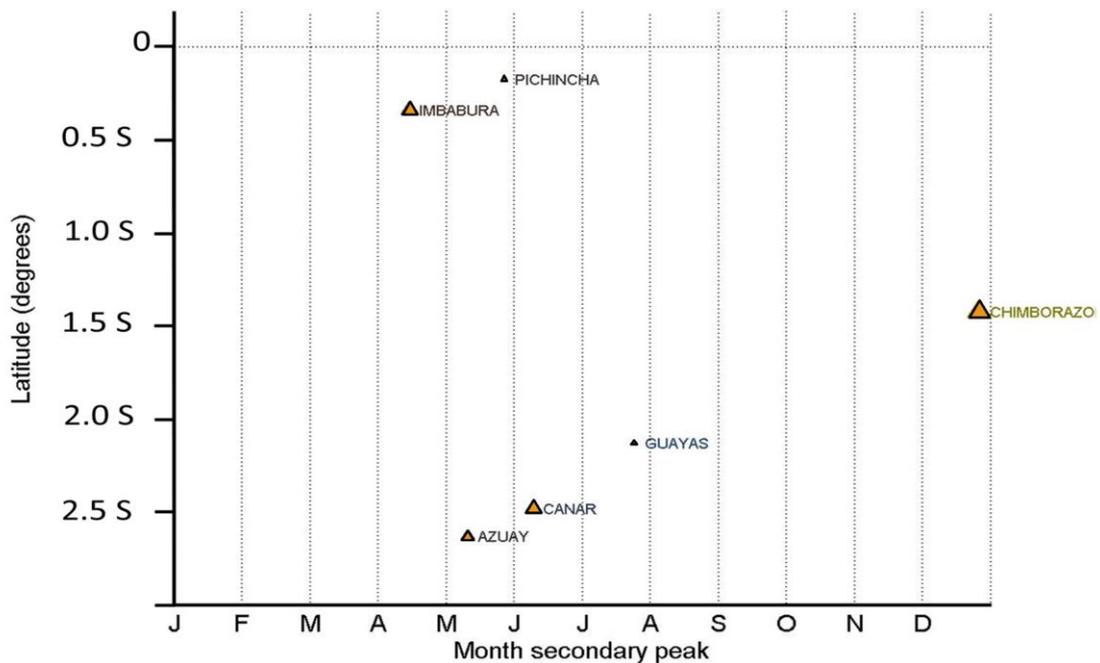


Figura 24. El Análisis de pico epidémico secundario, Influenza A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022. Los triángulos en la Figura representan el número de casos positivos de Influenza A/H3N2, con su tamaño indicando la cantidad de casos. El eje X muestra los meses del año en inglés, mientras que el eje Y representa la latitud, proporcionando una referencia geográfica a las provincias estudiadas en Ecuador.

Las provincias de Imbabura, Pichincha y Azuay presentan su pico primario en el mes de enero, Chimborazo y Guayas en los meses de agosto y septiembre; Cañar en el mes de agosto para el subtipo A/H1N1 pdm09. En lo referente al pico primario para el subtipo A/H3N2, Imbabura y Azuay lo presentaron durante el mes de diciembre; la provincia de Pichincha en el mes de enero; Chimborazo en mayo; Guayas en marzo y la provincia de Cañar lo presentó durante el mes de febrero (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de pico epidémico primario y secundario, subtipos de Influenza A/H1N1 pdm09 y A/H3N2 en Ecuador; 2012 - 2022.

Ubicacion	Provincia	FLU A/H1N1 PDM09		FLU A/H3N2	
		1° pico	2do pico	1° pico	2do pico
Norte	Imbabura	enero	mayo	diciembre	abril
Norte	Pichincha	enero	mayo	enero	junio
Medio	Chimborazo	septiembre	enero	mayo	diciembre
Sur	Guayas	agosto	enero	marzo	agosto
Sur	Azuay	enero	abril/mayo	diciembre	mayo
Sur	Cañar	julio/agosto	diciembre	febrero	junio

5.1.2. Temporalidad de Influenza B.

Se analizaron 532 casos positivos de Influenza B por mes desde enero del 2012 hasta junio del 2023. Estos casos proceden de seis regiones geográficas diferentes de Ecuador.

La Figura 25 ilustra el comportamiento epidemiológico del virus de Influenza B, que muestra un pico principal a inicios de cada año. A partir de marzo de 2020, se observó una interrupción en la circulación del virus de Influenza B, probablemente debido a la emergencia de la pandemia del SARS-CoV-2. Es importante destacar que en 2023 se registró el mayor número de casos identificados durante todo el período de estudio. Esto sugiere una reintroducción de la circulación del virus de Influenza B posterior al inicio de la pandemia.

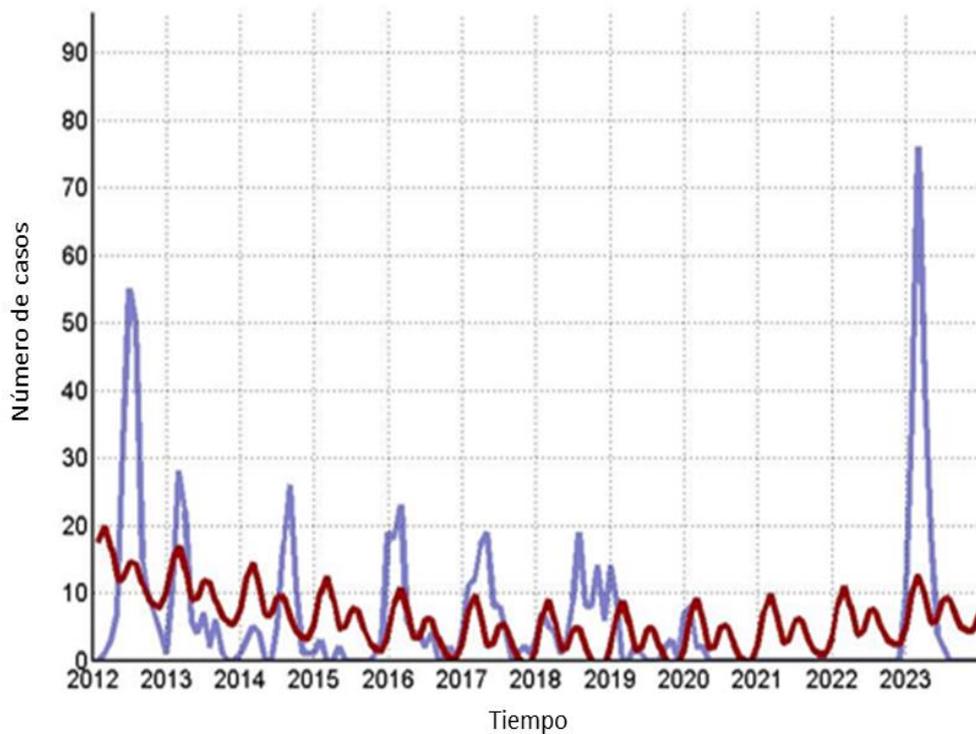


Figura 25. Estacionalidad de Influenza B en Ecuador; enero 2012 - junio 2023. La función periódica anual se muestra en rojo. La serie temporal original se muestra en lila.

En lo referente a Influenza B, en la Figura 26, muestra que febrero fue el mes con la mayor cantidad de casos positivos para este virus durante el período de estudio. Esta observación sugiere un patrón estacional en la incidencia de Influenza B, con un pico principal en el mes de febrero.

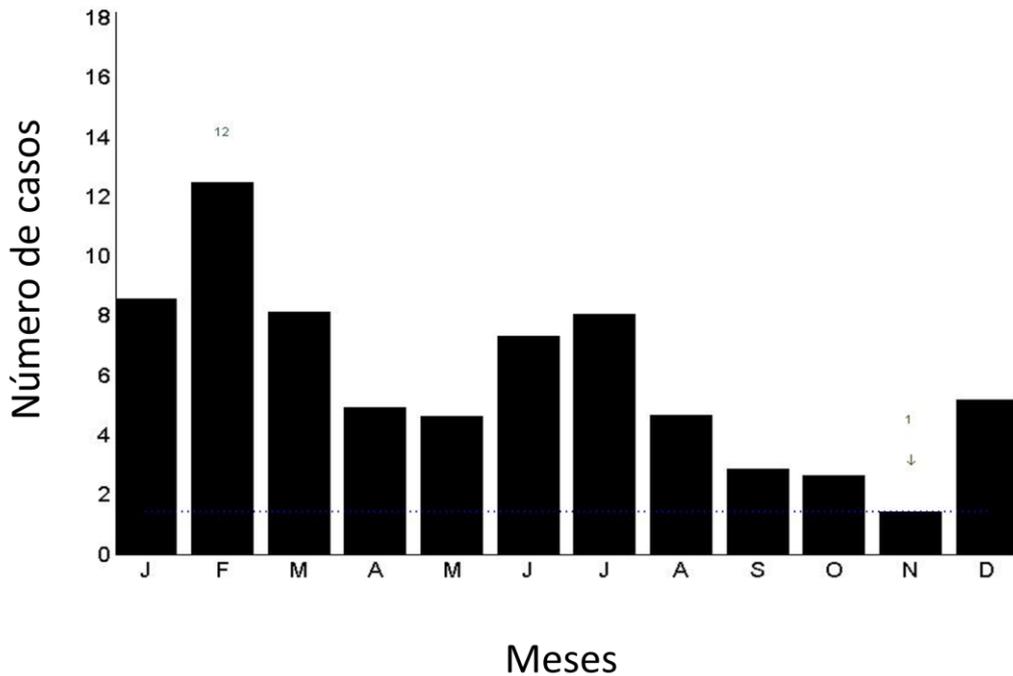


Figura 26. Estacionalidad de Influenza B por mes en Ecuador; enero 2012 - junio 2023. Esta figura de barras muestra la cantidad de casos de Influenza B presentados durante todo el período de estudio. Cada barra representa un mes del año y su altura indica la cantidad de casos positivos en ese mes. Los números 12 y 1 ubicados sobre la barra del mes de febrero y noviembre respectivamente, representan la cantidad de casos en los meses con la mayor y menor cantidad de casos presentados. Esta figura proporciona una visión clara de la estacionalidad de Influenza B en Ecuador.

En la Figura 27, se puede ver claramente como ingresa el virus de Influenza B por la zona centro y sur del país (Chimborazo, Guayas y Cañar). Las provincias de Imbabura, Pichincha y Azuay presentan su pico primario entre los meses de abril hasta julio, mientras que, las provincias de Chimborazo, Guayas y Cañar presentan su pico primario durante el mes de febrero.

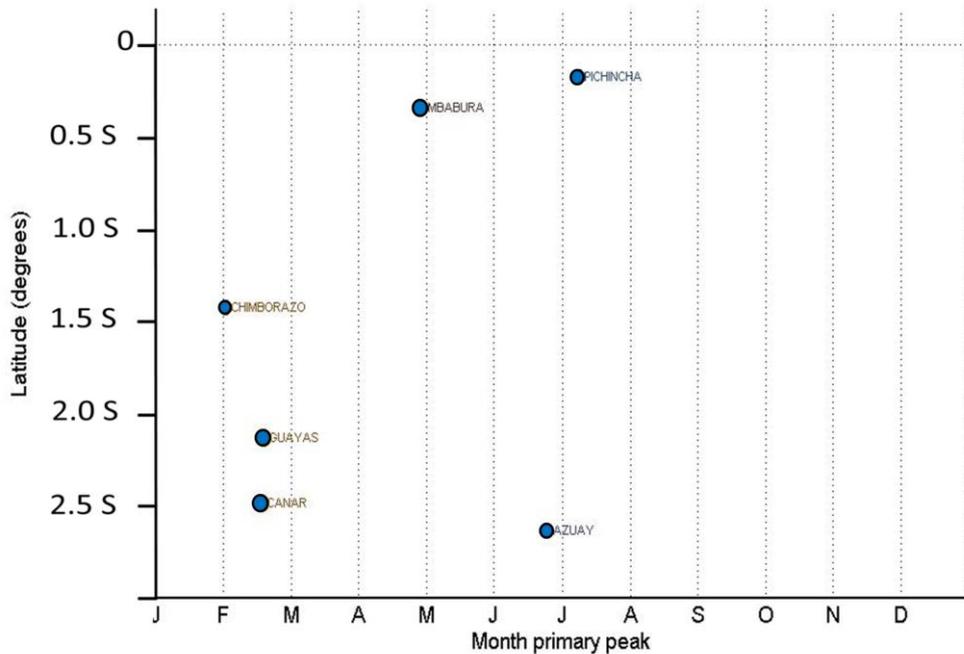


Figura 27. Análisis de pico epidémico primario, Influenza B en Ecuador; enero 2012 - junio 2023. Cada círculo en el gráfico representa la proporción de casos positivos de Influenza B, con su diámetro indicando la cantidad de casos. El eje X muestra los meses del año en inglés, mientras que el eje Y representa la latitud, proporcionando una referencia geográfica a las provincias estudiadas en Ecuador. Este análisis de pico primario proporciona una visión detallada de la prevalencia de la Influenza B en diferentes momentos y lugares del país.

Posteriormente, se analizaron los meses donde ocurren los picos secundarios causados por el virus de Influenza B (Figura 28). En Pichincha y Azuay se presentan durante el mes de enero, en Chimborazo en el mes de mayo; Guayas y Cañar lo presentaron en el mes de junio; finalmente, se encuentra la provincia de Imbabura, la cual, tiene su pico secundario en el mes de diciembre.

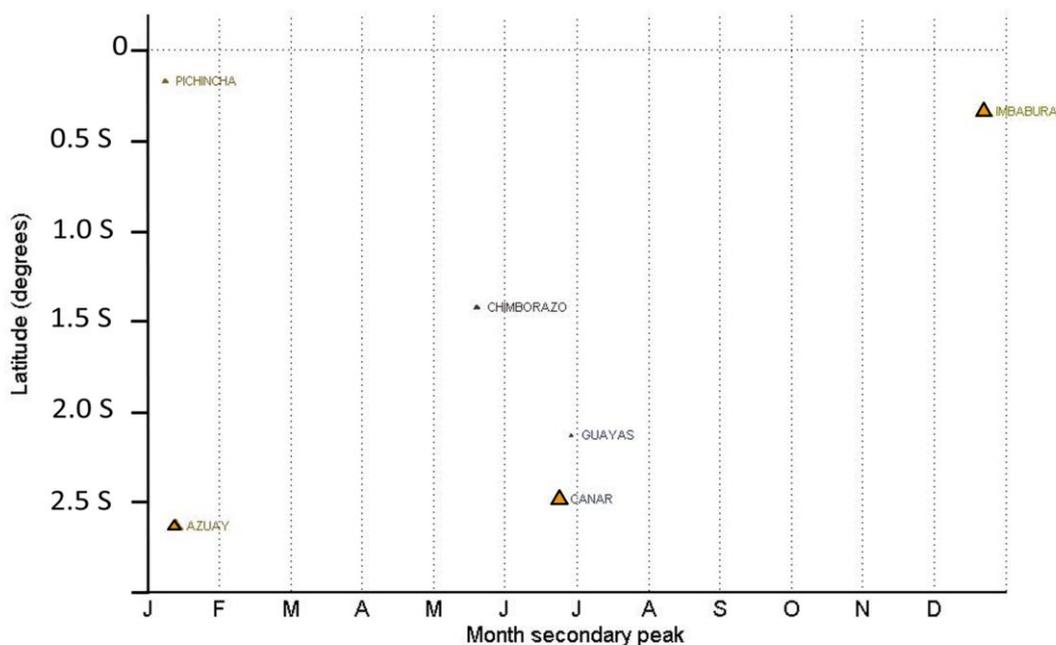


Figura 28. Análisis de pico epidémico secundario, Influenza B en Ecuador; enero 2012 - junio 2023. Los triángulos en la figura representan el número de casos positivos de Influenza B, con su tamaño indicando la cantidad de casos. El eje X muestra los meses del año en inglés, mientras que el eje Y representa la latitud, proporcionando una referencia geográfica a las provincias estudiadas en Ecuador.

La Tabla 4 presenta un análisis de la estacionalidad de los virus de Influenza A y B en las provincias de Ecuador estudiadas. La tabla muestra los meses en los que se observan los picos primarios y secundarios de la influenza en cada provincia.

Las provincias están agrupadas en tres regiones del país: Norte, Medio y Sur. Para cada provincia, se proporciona los meses de los primeros y segundos picos de incidencia para la Influenza A (FLU A) y la influenza B (FLU B).

Por ejemplo, en la provincia de Imbabura en la región norte, el primer pico de la Influenza A ocurre en enero y el segundo en junio. Para la Influenza B, el primer pico es en abril y el segundo en diciembre.

En el análisis realizado se muestra una periodicidad estacional, al igual que para los tipos de Influenza A y B con un pico de circulación viral primario identificado en el mes de febrero.

Tabla 4. Estacionalidad de Influenza A y B en Ecuador. Análisis de pico primario y secundario por provincias.

Ubicación	Provincia	FLU A		FLU B	
		1° pico	2do pico	1° pico	2do pico
Norte	Imbabura	enero	junio	abril	diciembre
Norte	Pichincha	enero	junio	julio	enero
Medio	Chimborazo	enero	junio	en/feb	mayo
Sur	Guayas	enero	septiembre	febrero	junio
Sur	Azuay	enero	septiembre	junio	enero
Sur	Cañar	febrero	julio	febrero	junio

La Tabla 5, evidencia los períodos de estudio, los tipos de Influenza identificados, el número de casos en comparación con el total de muestras analizadas, y el porcentaje de positividad entre los virus de Influenza. Estos datos provienen de muestras recibidas en el Centro Nacional de Influenza en la vigilancia de infecciones respiratorias agudas graves y reportadas en la plataforma de acceso público *Flunet*.

Tabla 5. Positividad anual de los virus de Influenza, Ecuador 2015 - 2023

Años	TIPO DE INFLUENZA		Total Influenza/Total casos	% Positividad Influenza	% Positividad Influenza A	% Positividad Influenza B
	A	B				
2015	99	29	128/3167	4	77	23
2016	520	67	587/4488	13	89	11
2017	236	86	322/3521	9,1	73	27
2018	735	98	833/4664	17,8	88	12
2019	312	26	338/3845	8,7	92	8
2020	69	13	82/2683	3	84	16
2021	17	0	17/4177	0,4	100	0
2022	418	12	430/5551	7,7	97	3
2023*	127	201	328/2840	11,5	39	61
TOTAL	2533	532	3065/34666	8,8	83	17

*Datos hasta la semana epidemiológica 27 del 2023.

Los años 2016 y 2018 presentaron mayor porcentaje de positividad para todos los tipos de Influenza, causada por el virus tipo A. El subtipo predominante en esos 2 períodos fue A/H1N1 pdm09. Los años que predominó el subtipo A/H3 fueron: 2015, 2017 y 2022.

Aunque la mayoría de años reflejan una mayor frecuencia de circulación del virus de Influenza tipo A, los virus de Influenza tipo B representan un 17 % entre todos los virus de Influenza circulantes. Este es un porcentaje considerable de casos que afectan a la salud pública del país, especialmente considerando que la atención tradicionalmente se centra en los virus tipo A y existe una comprensión limitada sobre la epidemiología de los virus de Influenza B.

5.2. Análisis de variabilidad genética y evolución molecular de Influenza estacional. Los resultados de la reconstrucción de la historia evolutiva de las poblaciones de Influenza A que circularon en diferentes localidades ecuatorianas son presentados en la Tabla 6. Se utilizaron códigos completos de genes de la región de la hemaglutinina de 67 A/H1N1 pdm09 de fecha 2016 al 2020 y 46 A(H3N2) secuencias de los años 2015 al 2019 de cinco ubicaciones ecuatorianas diferentes de las cuales se encontraron secuencias disponibles.

Las estimaciones medias indicaron que la provincia de Guayas tiene el tamaño de población efectivo más grande en comparación con cualquier otra localidad ecuatoriana estudiada para las cepas A/H1N1 pdm09. En el caso del subtipo A(H3N2), las provincias de Guayas y Cañar tienen el tamaño efectivo de población más grande en comparación con otras provincias incluidas en estos análisis (Tabla 6).

Con el fin de establecer las relaciones genéticas entre los virus de Influenza A que circulan en Ecuador, se construyeron árboles de máxima credibilidad para las cepas A/H1N1 pdm09 y A/H3N2 (Fig. 29 A y B).

En el árbol de AH1N1 pdm09 se observan tres clados principales: en el primer clado (desde la parte superior de la Figura 29 A), se agrupan secuencias provenientes de las provincias de Azuay, Chimborazo, Guayas, Pichincha, Manabí del período 2017 al 2019. En el segundo clado se encuentran secuencias de las provincias de Azuay, Guayas, Manabí, Pichincha del período 2019 y 2020. En el tercer clado se agrupan secuencias de Chimborazo, Pichincha, Guayas, Manabí del período 2016 – 2017.

Para el subtipo A/H3N2 de igual forma se observan tres principales clados: el primero representado en la parte superior de la Figura 29 B lado izquierdo, se observan secuencias procedentes de las provincias de Azuay, Pichincha, Chimborazo, Guayas, Pichincha, Chimborazo del período 2018 -2019.

El segundo clado donde se agrupan secuencias de las provincias de Pichincha, Chimborazo, Cañar, Guayas del período 2017 – 2019. El tercer clado ubicado en la parte inferior se observan secuencias procedentes de Guayas, Cañar, Chimborazo y Pichincha dentro del período 2016 – 2017.

Los resultados de estos estudios revelaron que diferentes linajes genéticos co-circulan en un mismo año. Por ejemplo, durante el año 2017 la secuencia H1/Ecuador/Pichincha/273797|2017-02-27 agrupada en el clado inferior de la Figura 29 A, sin embargo, en el mismo año 2017 se observaron varias secuencias de A/H1N1 pdm09 agrupadas en el primer clado superior ilustrado en la Figura 29 A que se encuentran co-circulantes (H1/Ecuador/Pichincha/300078|2017-12-23).

En el caso de las secuencias A/H3N2, se encontró de igual manera que varios linajes co-circulaban en diferentes clados en 2017, por ejemplo, la secuencia H3/Ecuador/Chimborazo/320331|2018-05-26 (segundo clado, Figura 29 B) y H3/Ecuador/Pichincha/355741|2018-11-20 (primer clado superior, Figura 29 B).

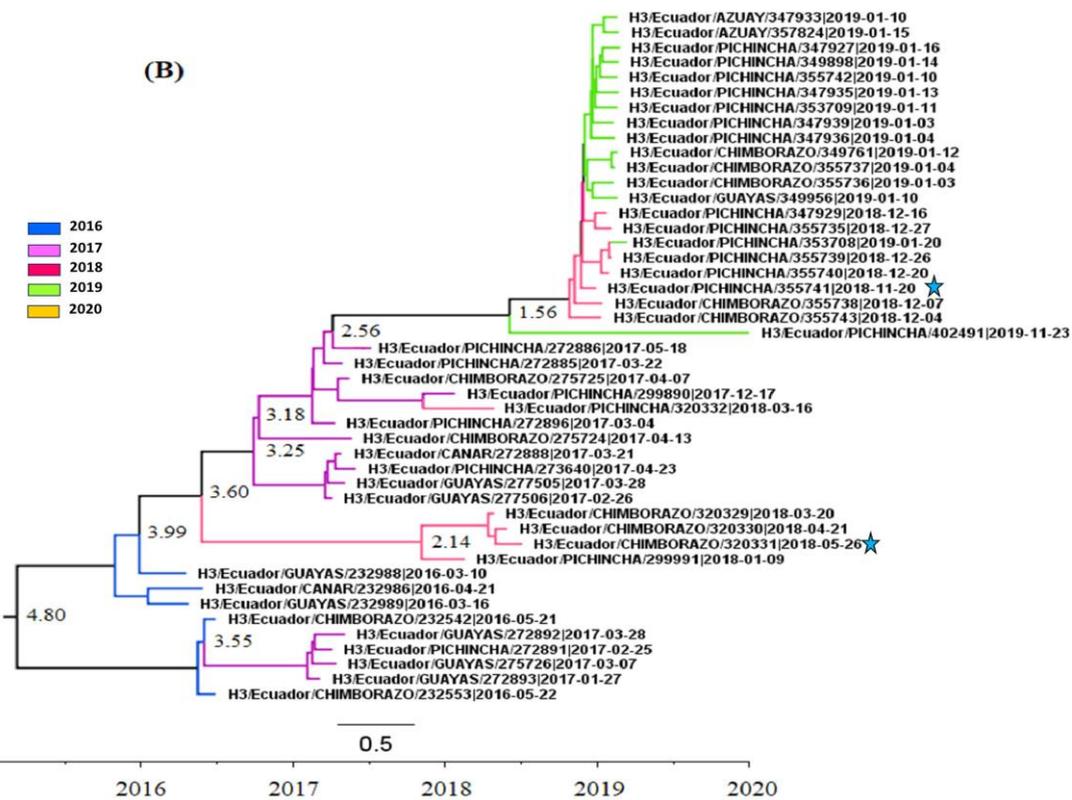
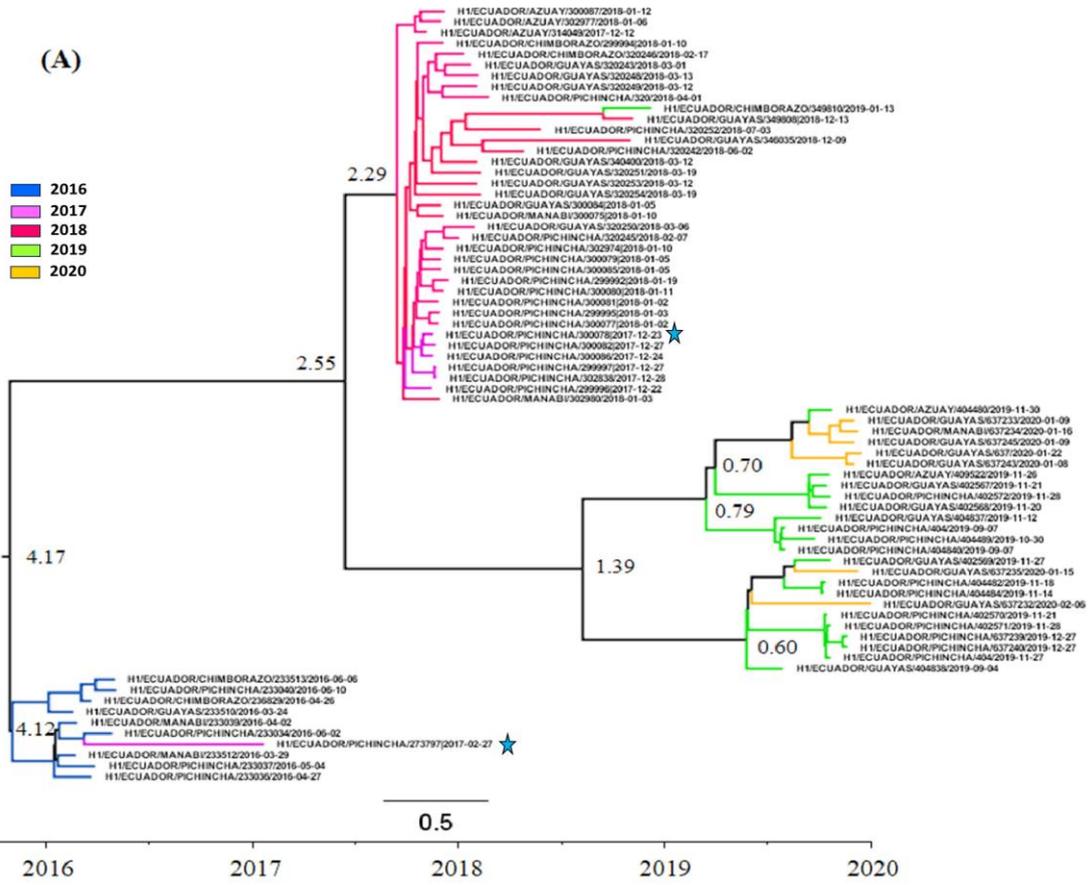


Figura 29. *Análisis del árbol filogenético bayesiano MCMC de las cepas de Influenza estacional que circulan en Ecuador. Se muestran los árboles de máxima credibilidad del clado obtenidos con el modelo de nucleótidos HKY+ γ . Los árboles tienen sus raíces en el ancestro común más reciente (MRCA). El tiempo hasta el MRCA se muestra en años en la parte inferior de la figura. La barra en la parte inferior de los árboles indica el tiempo en años. Los números junto a las ramas muestran la altura media de la rama. Las secuencias en el árbol se indican por tipo y nombre seguido de la fecha de detección. Los nodos están coloreados según el año de detección. Los resultados encontrados para las secuencias A/H1N1 pdm09 y A/H3N2 se muestran en (A) y (B), respectivamente. Las estrellas coloreadas ilustran los ejemplos referentes a la co-circulación de diferentes clados en un mismo año de estudio.*

La Figura 30, muestra la distribución a lo largo del tiempo, entre linajes Victoria y Yamagata. La filogenia se basa en la región de la hemaglutinina e incluye todas las secuencias obtenidas a partir de la base de datos GISAID; las secuencias del linaje B/Victoria de Ecuador en 2 clados claramente identificados: uno con muestras procedentes de los años 2016 – 2017 y el otro grupo con las secuencias del período 2022 y 2023.

En lo referente al linaje B/Yamagata de las secuencias de Ecuador, evidencian menor evolución molecular y se encuentran estrechamente relacionadas con la cepa de la vacuna tetravalente recomendada por la OMS para el hemisferio sur 2023 y hemisferio norte 2023 – 2024, (B/Phuket/3073/2013). Se puede observar que desde los años 2022 – 2023 existe circulación exclusivamente del linaje B/Victoria.

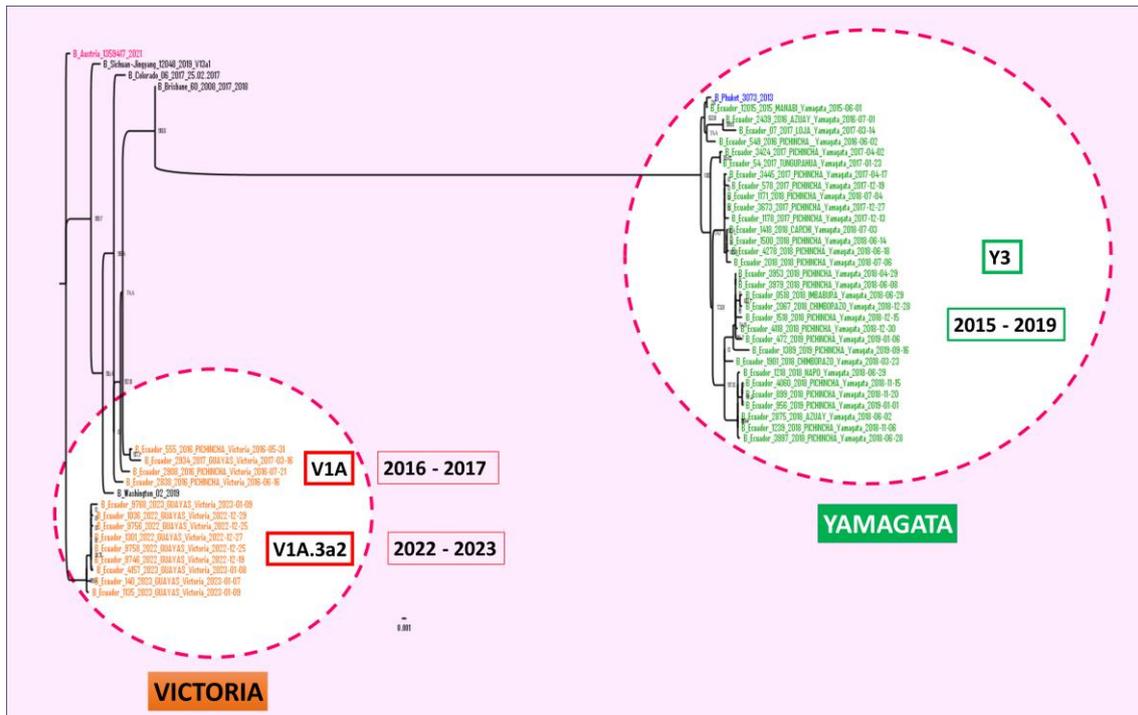


Figura 30. Filogenia del virus de Influenza tipo B en Ecuador 2015-2023. Árbol de máxima verosimilitud realizado con el programa W-IQ-TREE bajo el modelo GTR+G4+F -aln 20000000. Se analizaron 50 secuencias del virus de Influenza B. De color rosado se puede observar la cepa B/Victoria recomendada por parte de la OMS para la estación de Influenza del hemisferio norte 2023-2024; de color azul se representa la cepa vacunal tetravalente recomendada por la OMS para el hemisferio sur 2023 y hemisferio norte 2023 – 2024; de color naranja se encuentran agrupadas las secuencias del linaje B/Victoria de Ecuador; de color verde se encuentran representadas las secuencias pertenecientes al linaje B/Yamagata de Ecuador.

Para el análisis de evolución molecular realizado en la plataforma Nextclade se utilizaron secuencias del 2013 al 2020 para el subtipo A/H1N1 pdm09; para el subtipo A/H3N2 se utilizó el período 2015 al 2022 y para el virus de Influenza B Victoria se utilizaron secuencias del 2016 al 2023, mientras que para Influenza B/Yamagata, se utilizaron secuencias del 2015 al 2019.

Para el análisis de evolución molecular del virus de Influenza A/H1N1 pdm09 (Figura 31), se empleó la herramienta pública Nextclade (120). En la construcción del árbol filogenético, se utilizó como referencia la cepa A/California/07/2009. Este análisis ilustra los diferentes clados y subclados procedentes de Ecuador, permitiendo evidenciar la evolución del virus a lo largo del tiempo.

Se observa una notable variabilidad genética y una evolución molecular a través del tiempo, desde el clado 6 identificado en el año 2013, hasta el

subclado 6B.1A.5a.1, identificado en el 2020. Es importante destacar que durante la mayoría de los años de estudio existe una circulación de más de un clado anualmente. Esto resalta la complejidad y dinámica de la evolución del virus de Influenza A/H1N1 pdm09.

Molecular evolution Influenza A/H1N1 pdm 09, HA. Ecuador 2013 - 2020

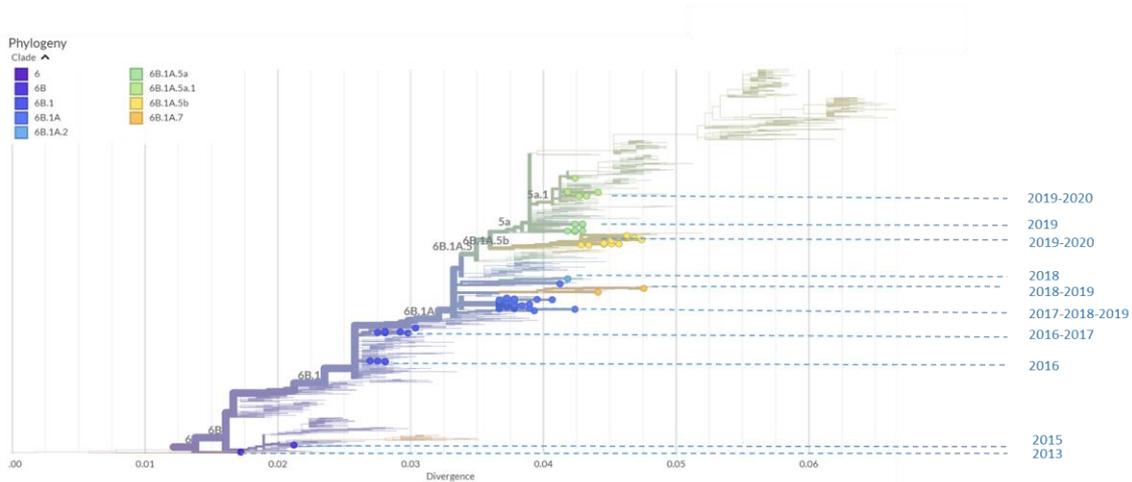


Figura 31. Análisis filogenético de los virus de Influenza A/H1N1 pdm09 Ecuador 2013 - 2020. El árbol filogenético muestra los clados y las ramas, representados por colores. Al final de cada unidad taxonómica operativa y hoja del árbol, se indica el año en el que se identificaron las secuencias genéticas. Esto permite determinar el período de circulación de las variantes genéticas del virus de Influenza A/H1N1 pdm09. Fuente: Nextclade. [https://clades.nextstrain.org/tree, 2023 \(120](https://clades.nextstrain.org/tree, 2023 (120)

En cuanto a la construcción del árbol filogenético del subtipo A/H3N2, se utilizó la cepa A/Wisconsin/67/2005 como referencia. La Figura 32 ilustra los diferentes clados y subclados procedentes de Ecuador y se puede evidenciar la evolución del virus a través del tiempo.

Se observó una gran variabilidad genética entre las secuencias analizadas, con la circulación de más de un clado en la mayoría de años de estudio. Esta variabilidad fue particularmente notable para el subtipo H3 en las secuencias analizadas de Ecuador durante el período de estudio.

Se identifican años que co-circularon subclados de diversos grupos genéticos. Por ejemplo, en 2015, las secuencias se agruparon en 4 ramas diferentes; en 2016 y 2017, en 5 ramas diferentes; en 2018 en 3 ramas diferentes; y en 2019,

en 2 ramas diferentes. Sin embargo, durante 2021 y 2022, las secuencias analizadas se agruparon en 3 ramas distintas del árbol filogenético.

En el período subsiguiente a la pandemia, se observó una notable disminución en la evolución del virus durante los últimos dos años de estudio.

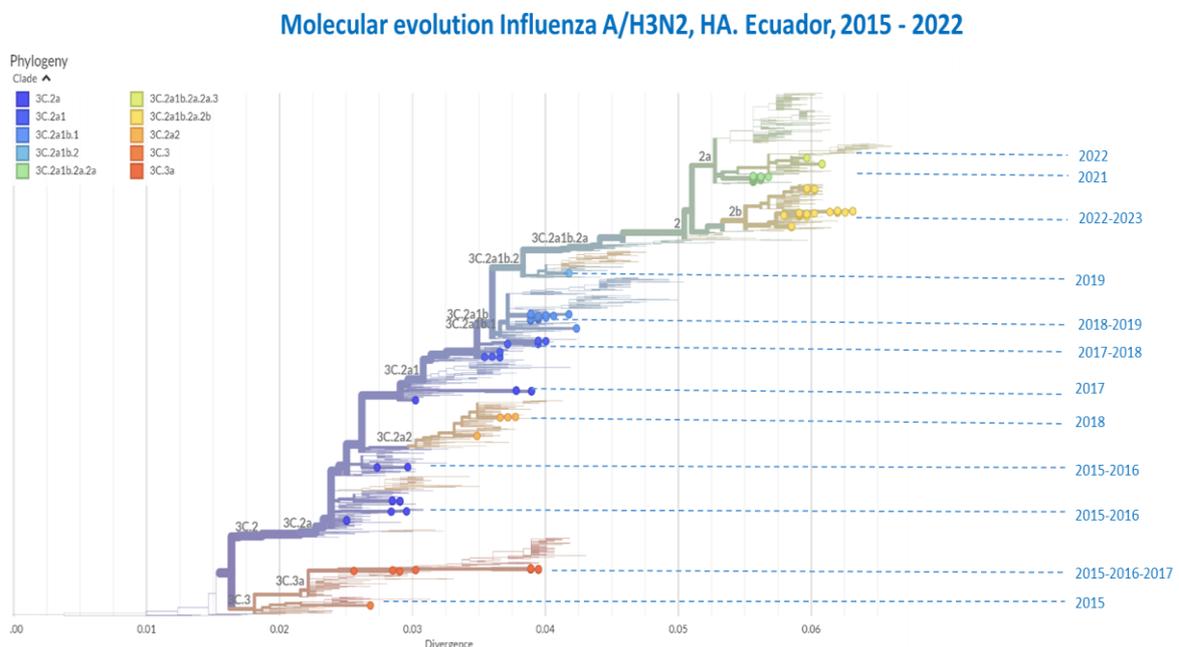


Figura 32. Análisis filogenético de los virus de Influenza A/H3N2, Ecuador 2015 - 2022. El árbol filogenético muestra los clados y las ramas, representados por colores. Al final de cada unidad taxonómica operativa y hoja del árbol, se indica el año en el que se identificaron las secuencias genéticas. Esto permite determinar el período de circulación de las variantes genéticas del virus de Influenza A/H3N2.

Para los virus de Influenza B/Victoria, se utilizó la cepa B/Brisbane/60/2008 como referencia en la construcción del árbol filogenético. La Figura 33 ilustra los clados V1A y V1A.3a.2 procedentes del Ecuador, evidenciando su evolución a través del tiempo.

Es notable que existe una menor variabilidad genética entre las secuencias analizadas en comparación con los subtipos de Influenza A.

Molecular evolution Influenza B/Victoria, HA. Ecuador, 2016 - 2023

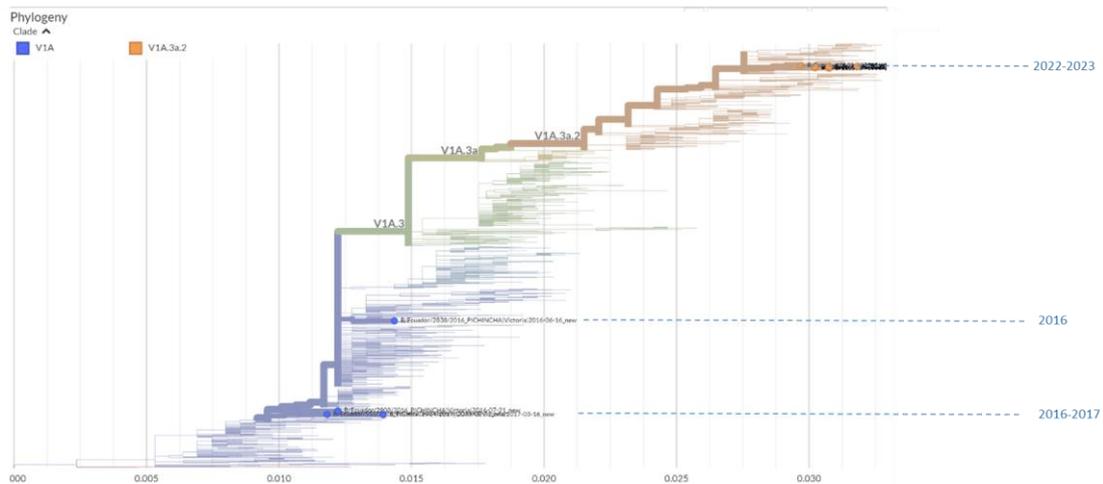


Figura 33. Análisis filogenético de los virus de Influenza B/Victoria, Ecuador 2016 - 2023. El árbol filogenético muestra los clados y las ramas, representados por colores. Al final de cada unidad taxonómica operativa y hoja del árbol, se indica el año en el que se identificaron las secuencias genéticas. Esto permite determinar el período de circulación de las variantes genéticas del virus de Influenza B/Victoria.

En relación a los virus de Influenza B/Yamagata se utilizó la cepa B/Wisconsin/01/2010 como referencia para la elaboración del árbol filogenético. La Figura 34 ilustra el clado dominante Y3 procedentes del Ecuador y se puede evidenciar la menor variabilidad genética entre las secuencias analizadas en comparación con los subtipos de Influenza A y el linaje de Influenza B/Victoria.

Molecular evolution Influenza B/Yamagata, HA. Ecuador, 2015 - 2019

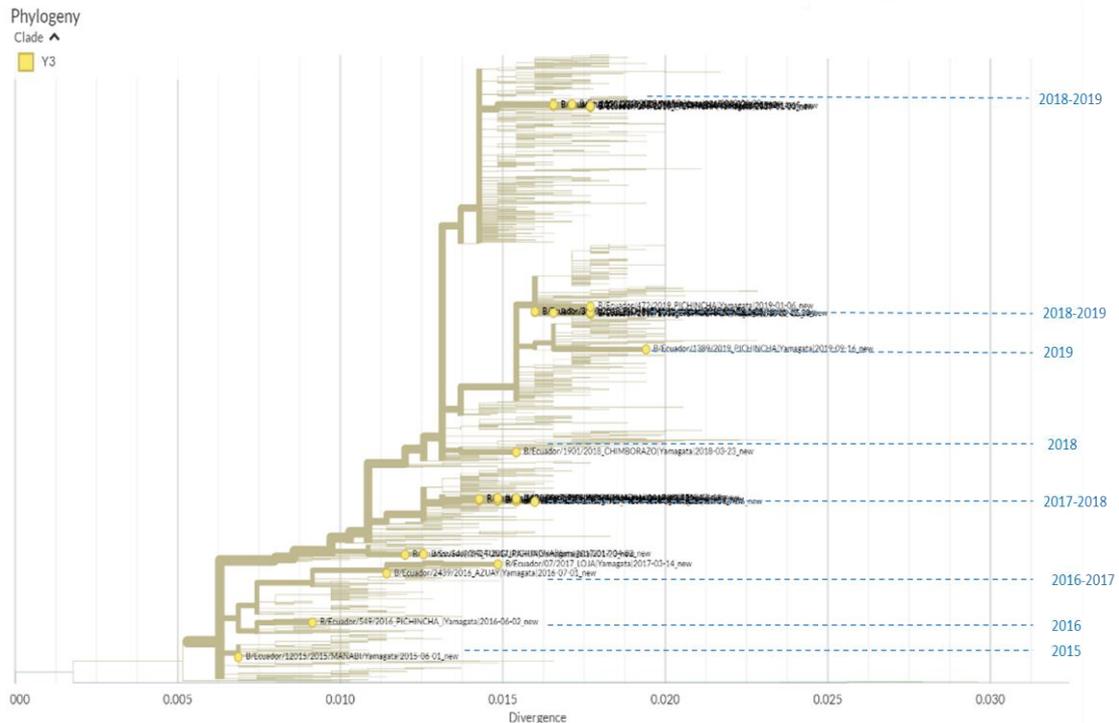


Figura 34. Análisis filogenético de los virus de Influenza B/Yamagata, Ecuador 2015 - 2019. El árbol filogenético muestra los clados y las ramas, representados por colores. Al final de cada unidad taxonómica operativa y hoja del árbol, se indica el año en el que se identificaron las secuencias genéticas. Esto permite determinar el período de circulación de las variantes genéticas del virus de Influenza B/Yamagata.

Para representar los gráficos de evolución molecular y abundancia relativa se utilizó un gráfico de tipo mullerplot realizado con la herramienta R (121, 122). En la Figura 35 se puede observar, para el caso del subtipo A/H1N1 pdm09, que el clado 6B.1 se identificó durante la mayor cantidad de años de estudio. No obstante, los subclados predominantes en el 2020 fueron 6B.1a.5b, seguido de 6B.1a.5a y 6B.1a.5a.1.

Molecular evolution Influenza and relative abundance A/H1N1 pdm 09, HA. Ecuador 2015 – 2020

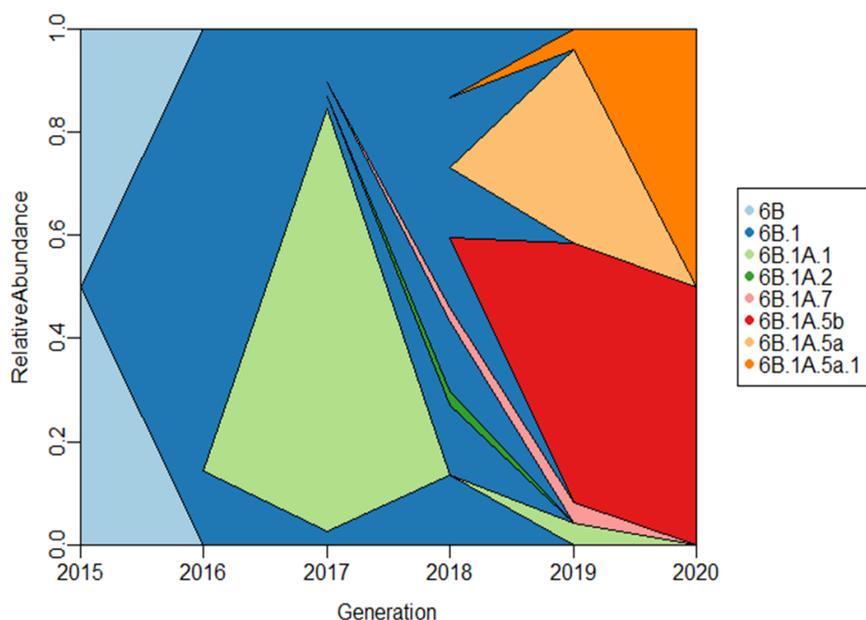


Figura 35. Evolución molecular y abundancia relativa de clados/subclados Distribución de clados/subclados por año del subtipo A/H1N1 pdm09, Ecuador 2015 - 2020. Sobre el eje de las Y se observa la abundancia relativa. Sobre el eje de las X describe los años de estudio y los colores indican el período de circulación de cada uno de los clados circulantes.

En la Figura 36 ilustra, en el caso del subtipo A/H3N2, que el clado 3C. evolucionó en diferentes subclados a través del tiempo. Durante los últimos años se observó un predominio de los subclados 3C.2a1b.2a.2a y 3C.2a1b.2b.

Molecular evolution Influenza and relative abundance A/H3N2, HA. Ecuador 2015 – 2023

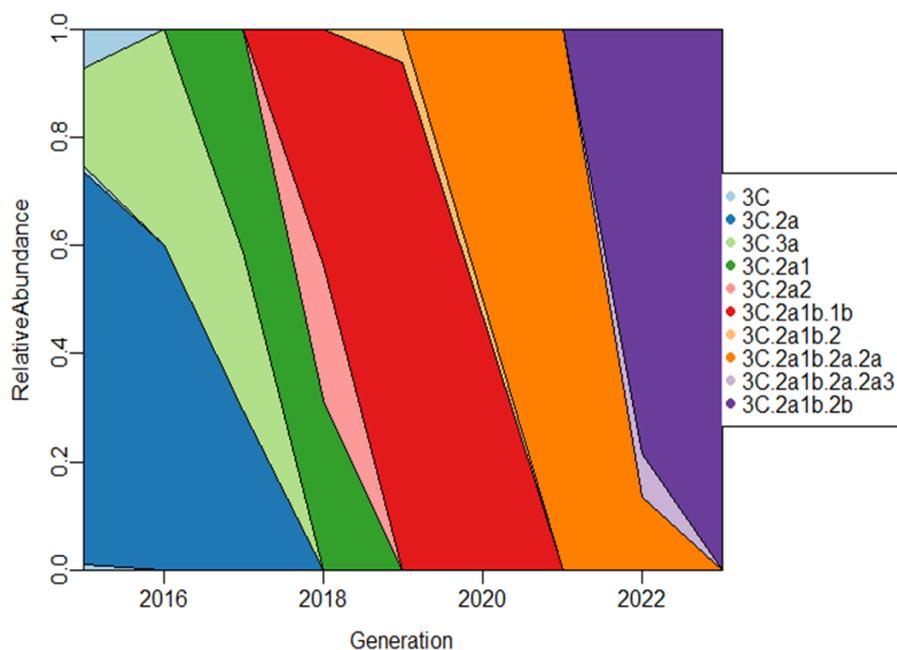


Figura 36. Evolución molecular y abundancia relativa de clados/subclados Distribución de clados/subclados por año del subtipo A/H3N2, Ecuador 2015 - 2023. Sobre el eje de las Y se observa la abundancia relativa, sobre el eje de las X presenta los años de estudio y los colores indican el período de circulación de cada uno de los clados circulantes.

En la Figura 37 se puede observar que no existe la circulación del linaje Yamagata representado por el color celeste en el último período de estudio, así como, el predominio absoluto del subclado V1A.3a2 (verde claro).

Molecular evolution Influenza B and relative abundance, HA. Ecuador 2015 – 2023

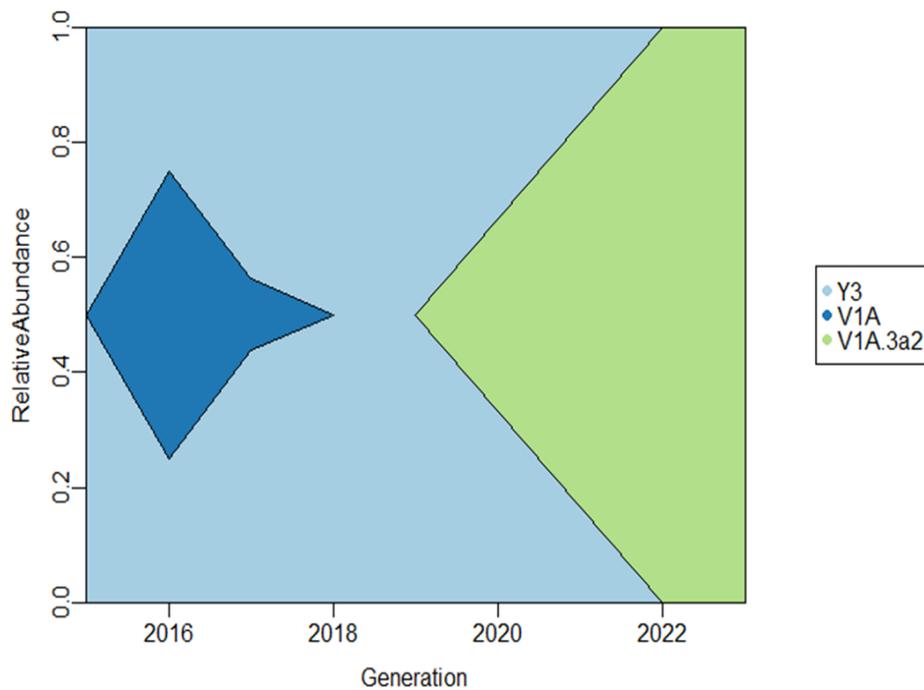


Figura 37. Evolución molecular y abundancia relativa de clados/subclados por año de Influenza B, Ecuador 2015 - 2023. Sobre el eje de las Y se observa la abundancia relativa. Sobre el eje de las X, presenta los años de estudio. Los colores indican el período de circulación de cada uno de los clados circulantes.

5.3. Presencia del marcador H275Y.

En relación al análisis del marcador H275Y, se puede observar en la Figura 38 que, tras el estudio de todas las secuencias genéticas disponibles de Ecuador, la secuencia H1/NA/ECUADOR/320250 de la provincia del Guayas, con fecha de captación de caso del 06 de marzo del 2018, presentó la mutación H275Y. Esta mutación está asociada como marcador molecular de resistencia al inhibidor de la neuraminidasa. El resto de secuencias no presentaron este cambio (124, 125).

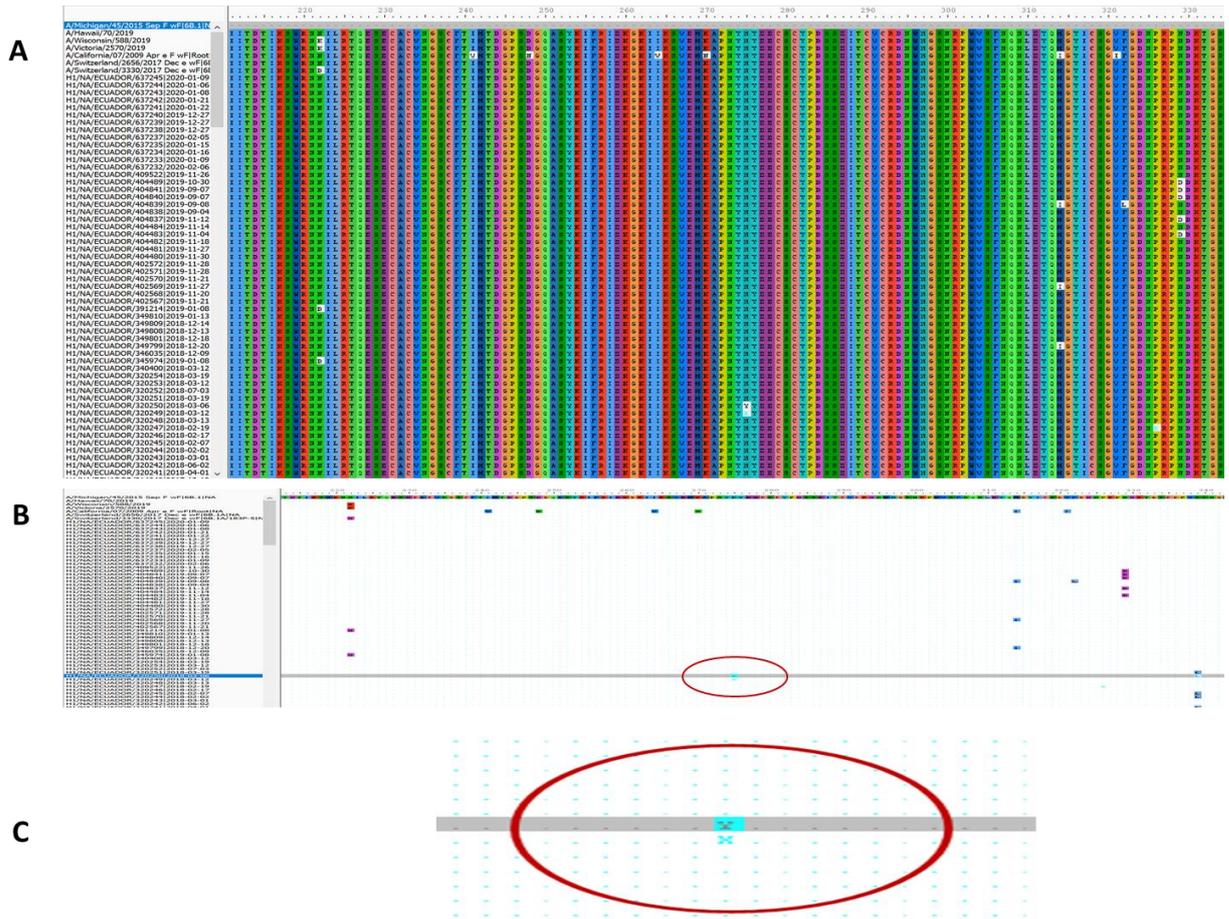


Figura 38. Alineamiento de aminoácidos de la región de la neuraminidasa entre secuencias vacunales y secuencias aisladas en Ecuador 2015-2020. El análisis fue realizado con la herramienta AliView - Alignment Viewer and Editor (126). En el literal A se ilustra el alineamiento de las secuencias investigadas. En el literal B, se representa mediante puntos las similitudes entre las secuencias analizadas y la cepa de referencia, las diferencias de aminoácidos se identifican mediante letras que resalta el remplazo de la ubicación a nivel de aminoácidos; de color azul se identifica la secuencia que presenta el cambio H275Y. En el literal C se realiza una ampliación del cambio de aminoácido Y en lugar del H en la posición 275 de la secuencia H1/NA/ECUADOR/320250.

La Figura 39 muestra el modelo de análisis realizado en una estructura 3D de la región de la neuraminidasa; esta sustitución se encuentra ubicada en la posición de referencia H275Y, que resulta en una sustitución de histidina por tirosina en la posición 275 y se encuentra asociada con la resistencia al oseltamivir.

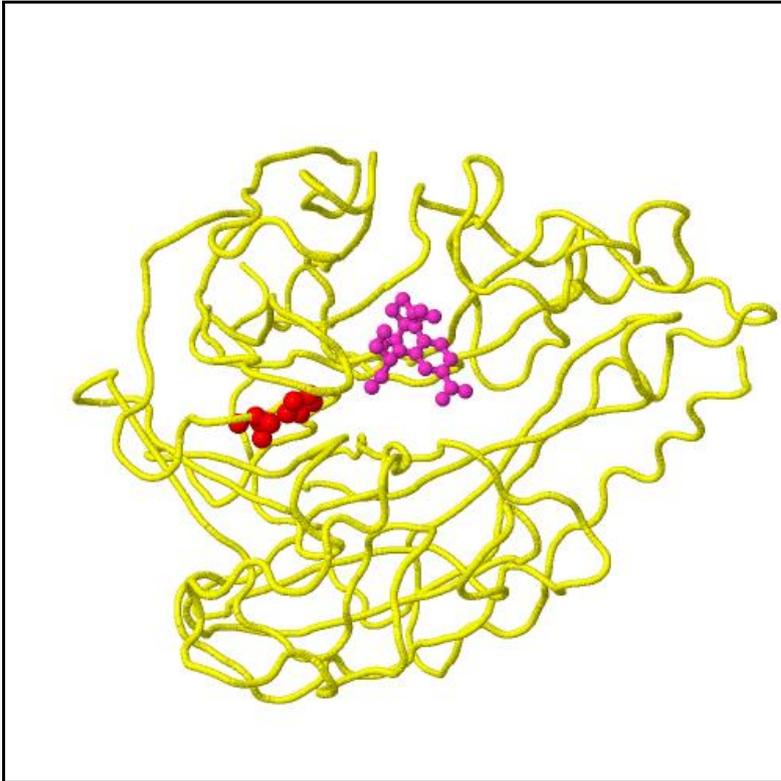


Figura 39. Modelaje de sustitución H275Y de secuencia de A/H1N1 pdm09 Ecuador en una estructura 3D de la proteína NA, obtenida mediante la herramienta fluserver <https://fluserver.bii.a-star.edu.sg> (127). La mutación H275Y, se representa con los átomos de color rojo, la cual, se encuentra asociada a una fuerte resistencia al oseltamivir; de color amarillo se representa la cadena de aminoácidos del virus; los círculos rosas representan la interacción con los átomos del fármaco antiviral (128).

5.4. Relación genética de cepas vacunales y secuencias de Influenza circulantes en Ecuador.

Es importante mencionar que la formulación de la vacuna del hemisferio norte es la utilizada en las campañas de prevención de Influenza en el Ecuador desde el año 2006. En la primera columna de la Tabla 7, se observan las diferentes recomendaciones vacunales realizadas por la OMS para los subtipos Influenza A/H1N1 pdm09, representado por el color naranja; A/H3N2, representado por el color celeste; Influenza B/Victoria, representado por el color verde oscuro; y B/Yamagata, representado por el color verde claro; la segunda columna representa el clado/subclado perteneciente a cada cepa vacunal.

De la columna tres en adelante, se representa cada uno de los años de aplicación de la vacuna, número de clados/subclados identificados en el país, según cada subtipo (A/H1N1 pdm09, H3 e Influenza B) y la concordancia antigénica analizada (clasificada como match para la similitud antigénica y

mismatch para la discordancia antigénica). Con la finalidad de representar de manera precisa la diferencia de la formulación vacunal de ambos hemisferios, se incorporó su identificación mediante las siglas HN para la recomendación del hemisferio norte y HS para la recomendación del hemisferio sur, resaltados con el color respectivo asignado para cada subtipo.

Para realizar el análisis de concordancia antigénica con respecto a la cepa vacunal recomendada, se utilizó la información descrita en cuanto a la caracterización antigénica anual, reportada por el Centro Colaborador de la OMS para la Red Global de Vigilancia de Influenza (CDC de Atlanta), donde se analizaron los datos de las titulaciones virales; adicionalmente, se tomó en consideración la similitud o discordancia de la mayoría de los clados circulantes con respecto a la cepa vacunal utilizada en el Ecuador (hemisferio norte).

Tabla 7. Relación genética y antigénica de la frecuencia de clados circulantes de Influenza en Ecuador 2015 – 2023, con respecto a la formulación anual de la vacuna recomendada por la OMS (94).

CEPA VACUNAL RECOMENDADA	CLADO/SUBCLADO	AÑO								
		2023	2022	2021	2020	2019	2018	2017	2016	2015
A/Victoria/4897/2022-like	6B.1A.5a.2a.1	HN/HS	HS							
A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09-like	6B.1A.5a.2		HN	HS						
A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019-like	6B.1A.5a.1			HN	5 (Mismatch)	1				
	6B.1A.5a					9				
	6B.1A.5b				5 (Mismatch)	12 (Mismatch)				
	6B.1A.7					1	1			
	6B.1A.2						1			
A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09-like	6B.1A.1				HN/HS	1		9		
A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-like	6B.1					HN/HS	HN/HS(34) (Match)	HS(2) (Match)	1 (Match)	
	6B									1 (Match)
A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like	1							HN	HN/HS	HN/HS
	3C.2a1b.2a.2b	1 (Match)	29 (Mismatch)							
	3C.2a1b.2a.2a3		3							
A/Darwin/9/2021 (H3N2)-like	3C.2a1b.2a.2a	HN/HS	HS(5)	14 (Mismatch)						
A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)-like	3C.2a1b.2a.1a		HN							
A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)-like	3C.2a1b.1b			HN/HS		15 (Mismatch)	7			
A/South Australia/34/2019 (H3N2)-like	3C.2a1b.2				HS	1				
A/Kansas/14/2017(H3N2)-like	3C.3a1				HN					
A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)-like	3C.2a2					HS	4 (Mismatch)			
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)-like	3C.2a1					HN	HS(1)	7		
A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like	3C.2a						HN	HN/HS(5) (Match)	HS (3) (Mismatch)	8 (Mismatch)
A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-like	3C.3a							5 (Mismatch)	HN(2)	HS(2)
A/Texas/50/2012 (H3N2)-like	3C									HN
A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like	3C									1
A/Perth/16/2009 (H3N2)-like	3C.3a									
B/Austria/1359417/2021-like (Vic)	V1A.3a.2	HN/HS(4) (Match)	HS(5) (Match)							
B/Washington/02/2019-like (Vic)	V1A.3		HN	HN/HS	HS					
B/Colorado/06/2017-like (Vic)	V1A.1				HN	HN/HS				
B/Phuket/3073/2013-like (Yam)	Y3					3 (Mismatch)	HS(18) (Mismatch)	7 (Mismatch)	HN(2)	HS(1) (Match)
B/Brisbane/60/2008-like (Vic)	V1A						HN	HN/HS(1)	HS(3) (Mismatch)	
B/Massachusetts/2/2012-like (Yam)	Y2									HN
B/Wisconsin/1/2010-like (Yam)	Y1									

Match: Concordancia antigénica
Mismatch: Discordancia antigénica

HN: Hemisferio norte **HS:** Hemisferio sur

Para el subtipo Influenza A/H1N1 pdm09, en los años 2015 – 2017, se aplicó la cepa vacunal A/California/7/2009 (clado1), no obstante, en el 2015 existía la circulación del clado 6B (1 secuencia) y en el año 2016 el clado 6B.1 (1 secuencia) en Ecuador. En el año 2017 existió la co-circulación de los clados 6B.1A.1 (9 secuencias) y 6B.1 (2 secuencias), por lo que en estos años no se evidenció una relación filogenética con la cepa recomendada y los clados circulantes. Las 2 secuencias del clado 6B.1 del año 2017 se encontraban relacionados con la formulación de la vacuna recomendada para el hemisferio sur (A/Michigan/45/2015), la cual, entraría en uso para el hemisferio norte en la siguiente estación de influenza del 2018.

En el 2018, existió concordancia con la cepa vacunal recomendada tanto para el hemisferio norte como para el hemisferio sur (A/Michigan/45/2015) con la mayoría de los virus circulantes en Ecuador (34 secuencias) del clado 6B.1; se identificaron en menor frecuencia 6B.1A.2 (1 secuencia) y 6B.1A.7 (1 secuencia).

En el año 2019, se identificaron co-circulando varios clados pertenecientes a 6B.1A.1 (1 secuencia); 6B.1A.7 (1 secuencia); 6B.1A.5b (12 secuencias); 6B.1A.5a (9 secuencias); 6B.1A.5a1 (1 secuencia); los cuales se encontraban divergentes de la cepa vacunal A/Michigan/45/2015 del clado 6B.1. Para el año 2020, se identificó la co-circulación de 6B.1A.5b (5 secuencias) y 6B.1A.5a1 (5 secuencias).

En lo referente al subtipo de Influenza A(H3), para el año 2015, se identificaron los siguientes clados 3C (1 secuencia); 3C.3a (2 secuencias) y 8 secuencias pertenecientes al clado 3C.2a. Estos clados se encontraban distantes del clado vacunal recomendado para el hemisferio norte 3C (Texas/50/2012), sin embargo, las 2 secuencias identificadas del clado 3C.3a se encontraban más cercana filogenéticamente con la recomendación del hemisferio sur del 2015 (A/Switzerland/9715293/2013).

En el año 2016, se reflejó concordancia con la cepa recomendada para el hemisferio norte A/Switzerland/9715293/2013 del clado 3C.3a con 2 secuencias identificadas, adicionalmente, se identificó la co-circulación con 3 secuencias pertenecientes al clado 3C.2a, relacionadas con la formulación del hemisferio sur A/Hong Kong/4801/2014.

Para el año 2017, hubo similitud con la cepa vacunal recomendada para el hemisferio norte y para el hemisferio sur, A/Hong Kong/4801/2014 del clado 3C.2a con 5 secuencias identificadas, adicionalmente existió co-circulación de los clados 3C.2a1 (7 secuencias) y 3C.3a (5 secuencias).

En el 2018, no se evidencia concordancia con la cepa vacunal (A/Hong Kong/4801/2014 del clado 3C.2a) y los clados del subtipo H3 identificados en Ecuador, los cuales, fueron los siguientes: 3C.2a1 (1 secuencia); 3C.2a2 (4 secuencias) y 3C.2a1b.1b (7 secuencias). No obstante, una de las secuencias

del clado 3C.2a1, se encontraba relacionada con la cepa vacunal del hemisferio sur A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016.

Durante el año 2019, no reflejo concordancia con la cepa vacunal, el clado predominante del subtipo H3, fue el 3C.2a1b.1b (15 secuencias), seguido de 3C.2a1b.2 (1 secuencia) los cuales se encontraban distante de la cepa vacunal recomendada de ese período (A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)-like del clado 3C.2a1).

En el año 2021, el clado predominante entre las secuencias identificadas en Ecuador, fue el 3C.2a1b.2a.2a (14 secuencias), sin embargo, la cepa recomendada para el año 2021 era A/Hong Kong/2671/2019 del clado 3C.2a1b.1b, por lo que no existía concordancia entre la circulación viral y la cepa vacunal recomendada para el 2021.

En el año 2022 se introdujo la cepa vacunal recomendada para el hemisferio norte A/Cambodia/e0826360/2020 del clado 3C.2a1b.2a.1a, la cual, no se relacionó con los clados circulantes en Ecuador, los cuales, fueron: 29 secuencias del clado 3C.2a1b.2a.2b, seguido de 5 secuencias del clado 3C.2a1b.2a.2a, las cuales se encuentran mayormente relacionadas con la recomendación de la vacuna del hemisferio sur A/Darwin/9/2021 (H3N2)-like, adicionalmente se identificaron 3 secuencias del clado 3C.2a1b.2a.2a3. En el año 2023 se identificó una secuencia perteneciente al clado 3C.2a1b.2a.2b.

En lo referente a los reportes de caracterización antigénica realizada por el Centro Colaborador de la OMS (CDC de Atlanta) a través de las prueba de inhibición de hemaglutinación, se puede observar que para el subtipo A/H1N1 pdm09 en el período 2015 hasta el 2018 existió buena concordancia antigénica con la cepa vacunal recomendada, no obstante, en los años 2019 y 2020, los virus circulantes presentaron una mayor divergencia antigénica con respecto a las formulaciones asignadas a este período, probablemente debido al proceso natural de evolución viral.

El subtipo A/H3N2, presentó una mayor distancia antigénica con respecto a las cepas recomendadas y se observa en la mayoría de casos, que los virus circulantes en el Ecuador, se adelantan uno o dos estaciones a las cepas

recomendadas en las vacunas, esto considerando que el subtipo AH3N2 presenta una mayor evolución viral que los otros tipos y subtipos estacionales.

Finalmente, para los subtipos de Influenza A (A/H1N1 pdm09 y A/H3N2), en varios de los años de estudio, se pudo observar que los virus circulantes en el Ecuador, se presentaron una temporada o dos previo a los virus recomendados en las cepas vacunales.

En lo referente a los genotipos de Influenza B, existió una diferencia antigénica con la cepa en la vacuna trivalente del hemisferio norte recomendada anualmente durante el período 2016 – 2019, en los que corresponde a los años 2015, y 2022 – 2023, presentaron similitud antigénica con las cepas vacunales recomendadas.

En lo que respecta al análisis de clados de los linajes de Influenza B, se puede mencionar que, durante el 2015, se identificó 1 secuencia perteneciente al linaje Yamagata, sin embargo, esta secuencia se encontraba agrupada en el clado Y3 y distante del clado Y2 de la cepa vacunal B/Massachusetts/2/2012-like (Yam), pero con similitud genética con la cepa recomendada para el hemisferio sur (B/Phuket/3073/2013 del linaje Y3).

En el año 2016, existió co-circulación de los linajes B/Victoria del clado V1.A (3) relacionada con la cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur B/Brisbane/60/2008 y 2 secuencias agrupadas en el clado Y3 del linaje B/Yamagata, el cual, se encontraba en concordancia con la cepa vacunal trivalente recomendada por la OMS para el hemisferio norte (B/Phuket/3073/2013 del linaje Y3).

Para el año 2017, se identificó una mayor frecuencia de casos de Influenza B/Yamagata (7 casos), sin embargo, la cepa trivalente recomendada para ambos hemisferios de ese año era B/Victoria (B/Brisbane/60/2008), de las cuales, se identificó un caso relacionado con este linaje.

Para el año 2018, se detectó 18 secuencias pertenecientes al linaje Yamagata del clado Y3, la cual se encuentra en el grupo de la cepa vacunal del hemisferio sur B/Phuket/3073/2013, sin embargo, la cepa trivalente recomendada para el hemisferio norte de ese año era B/Victoria (B/Brisbane/60/2008).

En el año 2019, se detectaron 3 secuencias en Ecuador pertenecientes al linaje Yamagata, sin embargo, la vacuna trivalente para el 2019 del hemisferio norte y sur recomendadas, fueron del linaje B/Victoria (B/Colorado/06/2017). En el presente estudio, a diferencia de otros países de la región, nunca se evidenció secuencias de Influenza B/Victoria con la doble delección de la cepa B/Colorado/06/2017.

En lo que respecta a los años 2022 y 2023 se identificó exclusivamente circulación del linaje B/Victoria con 5 y 4 secuencias reportadas respectivamente pertenecientes al clado V1.A.3a.2. Cabe mencionar que para estos dos años, existió una concordancia con los linajes circulantes y la cepa vacunal recomendada por la OMS en la vacuna trivalente, sin embargo, existió diferencias en cuando a los clados de las cepas vacunales (B/Washington/02/2019 para el 2022 perteneciente al clado V1A.3 y B/Austria/1359417/2021 del clado V1.A.3a.2 para el 2023).

En la Tabla 8, se ilustra un análisis de los linajes de Influenza B identificados en Ecuador mediante qRT-PCR durante el período del 2015 al 2023, evaluando la concordancia con el linaje incluido en la formulación de la vacuna trivalente recomendada por la OMS para el hemisferio norte.

Tabla 8. Análisis de concordancia de la formulación de la vacuna de Influenza B recomendada para el Hemisferio Norte y los linajes circulantes identificados Ecuador 2015 – 2023.

Años	Linaje Victoria	Linaje Yamagata	Cepa Vacunal HN	Linaje Predominante	%Predominio	Resultado
2015	4	1	Yamagata	Victoria	80,00 %	Discordante
2016	27	2	Yamagata	Victoria	93,00 %	Discordante
2017	5	62	Victoria	Yamagata	92,00 %	Discordante
2018	3	44	Victoria	Yamagata	94,00 %	Discordante
2019	0	3	Victoria	Yamagata	100,00 %	Discordante
2020	2	1	Victoria	Victoria	33,00 %	Concordante
2021	0	0	Victoria	0	N/A	N/A
2022	5	0	Victoria	Victoria	0,00 %	Concordante
2023*	114	0	Victoria	Victoria	0,00 %	Concordante

*Datos hasta la semana epidemiológica 27 del 2023.

Se puede observar en la primera columna los años de la evaluación realizada, en la segunda y tercera columna los linajes de Influenza B genotipificados en Ecuador Victoria y Yamagata respectivamente, en la cuarta columna se encuentra detallado la cepa vacunal recomendada del hemisferio norte por

cada año, en la quinta columna el linaje predominante en Ecuador según los datos disponibles, la sexta columna nos indica el porcentaje de predominio que se identificó entre las muestras que pudieron ser genotipificadas y la última columna el resultado si fue considerado como resultado concordante o discordante entre la cepa vacunal recomendada y el genotipo que predominó en circulación de Influenza B en el Ecuador.

Un resultado discordante de la vacuna contra Influenza B, se definió como un desajuste entre el linaje de Influenza B incluido en la vacuna y el linaje identificado en la mayoría de los casos en cada año de estudio (>60 %). La información sobre la composición de la vacuna de Influenza se obtuvo de los informes técnicos de las formulaciones anuales vacunales de la Influenza emitidos por el grupo técnico asesor de OMS (38, 94).

5.5. Análisis filogenético del brote de Influenza aviar H5N1 en aves de corral en Ecuador en noviembre 2022.

Durante la ejecución de la presente tesis, se realizó la publicación de un artículo denominado: *Phylogenetic analysis reveals that the H5N1 avian influenza A outbreak in poultry in Ecuador in November 2022 is associated to the highly pathogenic clade 2.3.4.4b.133*, 27–30. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.04.403>, en el cual se identifica el clado genético causante del brote de Influenza aviar H5 en Ecuador (100).

La Figura 40 muestra que los virus A/H5N1 identificados en Ecuador pertenecen al clado altamente patógeno 2.3.4.4b. Esta cepa está estrechamente relacionada con los virus A/H5N1 del mismo clado aislados de un zorro rojo de Canadá y un halcón de México. El nodo que une a los virus de Ecuador, Perú y Chile tiene una probabilidad posterior de 1, lo que genera mayor confianza de compartir un ancestro común.

Se utilizó el software MAFFT para el alineamiento de la región de la Hemaglutinina de las muestras seleccionadas. El modelo de sustitución invariable de Hasegawa-Kishino-Yano fue determinado como el modelo más adecuado para la alineación con el software jModeltest 2.1.10. Se realizó un muestreo de Cadenas de Markov Bayesianas en Beast versión 2.7.1 utilizando

un reloj molecular strick con el Coalescent Bayesian Skyline prior con 10 millones de generaciones.

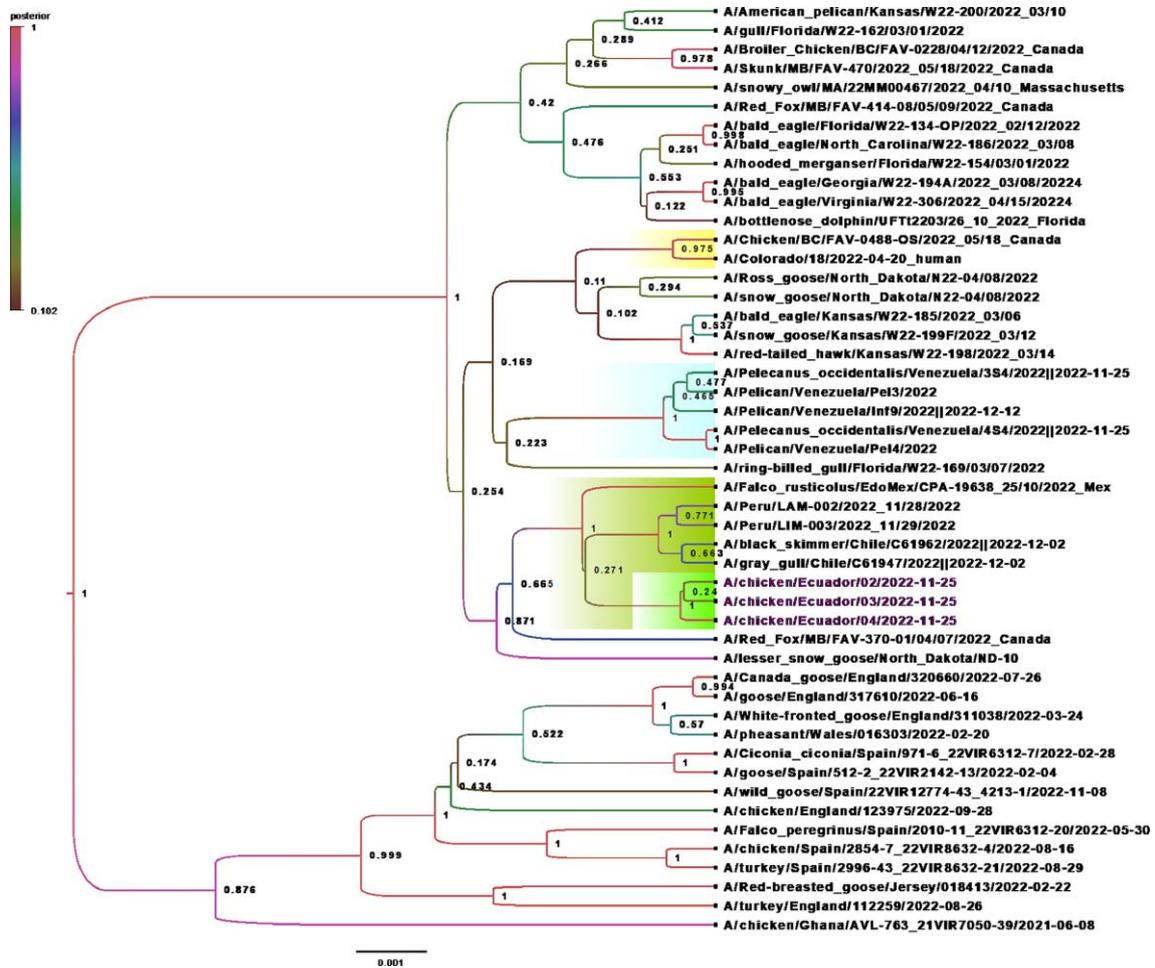


Figura 40. Filogenia del clado 2.3.4.4b del HPAIV A(H5N1) en las Américas en 2021-2023. Muestra la distribución a lo largo del tiempo, entre especies y países. La filogenia se basa en la hemaglutinina e incluye todas las secuencias de las Américas del clado 2.3.4.4b en 2021-2023 (excluyendo secuencias idénticas) resultantes de la búsqueda BLAST en la base de datos GISAID EpiFlu, utilizando como referencia las secuencias virales identificadas en Ecuador; además, se incluyeron otros clados representativos 2.3.4.4b de África y Europa. El gradiente de color fue utilizado para mostrar la probabilidad posterior de cada nodo del árbol como medida de confianza de la existencia del nodo. El gradiente más oscuro indica mayor probabilidad posterior, mientras que el gradiente más claro indica menor probabilidad posterior. Se utilizó el método bayesiano de las cadenas de Markov de Montecarlo, ejecutando un reloj molecular estricto con un Coalescent Bayesian Skyline de 10 millones de generaciones.

6. DISCUSION

Las recomendaciones anuales de vacunación contra la Influenza de la OMS están diseñadas para garantizar la entrega de la vacuna antes del pico invernal de circulación viral en cada hemisferio. Sin embargo, este proceso funciona bien en países con climas templados, pero su aplicación en países con climas tropicales y subtropicales aún enfrenta desafíos para decidir la óptima formulación de la vacuna a utilizar, considerando que estas recomendaciones se han basado en la evidencia de los países templados de los respectivos hemisferios, donde según datos de Hirve y la Organización Mundial de la Salud, residen aproximadamente el 57 % (hemisferio norte) y el 2% (hemisferio sur), de la población mundial (129).

Existe una notable escasez de evidencia sobre la información genética, antigénica, epidemiológica, la distribución espacial y la tasa de propagación de los virus de Influenza que circulan en los países tropicales, donde reside el 41% de la población mundial. Estos son factores importantes para determinar que cepa vacunal sería más apropiada para un país ubicado en el trópico.

Los patrones estacionales de la Influenza son muy diversos en los países tropicales y en algunas ocasiones puede no coincidir con las recomendaciones de la OMS para sus respectivos hemisferios (130). De hecho, estudios previos revelaron que el momento óptimo para la vacunación contra la Influenza puede no corresponder al esperado para su hemisferio en las regiones tropicales de América del Sur (131).

Ecuador es un país sudamericano situado en la línea ecuatorial y en términos de estrategias de prevención contra el virus de Influenza, es el único país de América del Sur que utiliza la formulación del hemisferio norte para la vacunación, según Durand et al., 2016 (16). Por ende, con la finalidad de comprender de mejor manera la dinámica de los virus de Influenza en un país tropical como Ecuador, se estimaron los parámetros estacionales y se obtuvo la función de tiempo periódico para las epidemias de Influenza A en este país.

Los resultados de estos estudios revelaron que, aunque Ecuador es un país tropical de América del Sur, su epidemiología se asemeja a la de los países

templados del hemisferio norte, con picos primarios mensuales en enero, mientras que, para Influenza B, los picos primarios se presentan principalmente en el mes de febrero. Estos hechos sugieren que la temporada de vacunación del hemisferio norte es más apropiada para el Ecuador.

El retraso existente de seis meses entre las recomendaciones de los expertos de la OMS y la disponibilidad de la vacuna se debe a las limitaciones de la tecnología actual utilizada en el proceso de fabricación, lo que representa un grave desafío para la eficacia de la vacuna. Por estas razones, es importante investigar los patrones nacionales de circulación del virus de la Influenza en los países tropicales para estimar el momento más apropiado para administrar la vacuna contra la Influenza más adecuada. (132, 133)

Existen otras condiciones climatológicas que también pueden incidir en los patrones de circulación viral, entre ellos, los niveles de precipitación y humedad sobre todo en países tropicales, tal como se ha descrito por Tamerius et al., 2013, en su estudio denominado: “*Environmental Predictors of seasonal Influenza Epidemics across Temperate and Tropical climates*” (134).

Los picos primarios mensuales revelaron una fuerte correlación con los meses de alta precipitación y humedad en todas las localidades ecuatorianas estudiadas. Esto está de acuerdo con estudios previos que sugerían que las epidemias en regiones tropicales y subtropicales a menudo ocurren durante los períodos de alta humedad (134).

Este patrón también se observó en otras regiones tropicales del mundo, como Tailandia (135) o Costa de Marfil, donde las lluvias son un buen predictor de la actividad de Influenza (136). En el caso de América Central, la actividad general de Influenza se asoció fuertemente con el aumento de la humedad específica en tres países tropicales diferentes, pero se encontraron resultados dispares entre la asociación de la temperatura y la precipitación, donde se encontró una correlación positiva para El Salvador y Panamá. Sin embargo, se encontró una correlación negativa para Guatemala (137). Esto fundamenta la necesidad de caracterizar la actividad de Influenza en cada país tropical en particular.

Se encontró que la provincia del Guayas tiene el tamaño efectivo de población más grande para las cepas de Influenza A/H1N1 pdm09, mientras que Guayas y Cañar tienen los tamaños efectivos de población más grandes en el caso de los virus A(H3N2) (Tabla 6). Los resultados de estos estudios sugieren que las provincias del sur del Ecuador pueden actuar como fuente de Influenza mientras que otras provincias pueden actuar como sumidero. Se necesitarán más estudios para abordar este importante tema.

Se evidenció una co-circulación de diferentes linajes genéticos en las cepas A/H1N1 pdm09 y A/H3N2 aisladas en Ecuador durante el mismo año epidémico, lo cual se puede apreciar en los gráficos de tipo mullerplot. Estos gráficos permiten combinar información sobre la sucesión de diferentes unidades taxonómicas operativas (OTU) como genotipos, fenotipos o especies, realizar estudios de diversidad, evolución genética e ilustrar su dinámica a través del tiempo.

Adicionalmente, se observó que existe un retraso entre los virus recomendados con la cepa vacunal y los virus circulantes en Ecuador, especialmente para los tipos de Influenza A (A/H1N1 pdm09 y A/H3N2), en varios años de estudio. Una situación similar se ha descrito para los virus de Influenza A/H3N2 en países ubicados en la línea ecuatorial, según Hirve y la Organización Mundial de la Salud, 2015 (129).

La evolución de los genes de la HA y NA, influyen en la transmisión del virus de la gripe, esto incluye la deriva antigénica y acumulación de sitios de N-glicosilación (138). La N-glicosilación de la HA actúa para enmascarar los epítopes antigénicos, limitar la unión a los anticuerpos del huésped y equilibrar las actividades de la HA (139).

Las secuencias de los virus de Influenza A/H1N1 pdm09 identificados en Ecuador, presentaron cambios a nivel de sitios de glicosilación con respecto a la cepa vacunal A/Victoria/4897/2022. Es importante determinar si estos representan un papel importante en la dinámica de evolución viral. No obstante, desde el 2018, no se evidencia diferencias entre el número y la ubicación de los sitios de glicosilación (Anexo 5 y 6).

En el Anexo 7, se compara la ubicación de los aminoácidos en la región de la hemaglutinina del subtipo H3. Esta comparación se realiza entre la cepa recomendada por la OMS en la formulación del hemisferio sur 2023 (A/Darwin/9/2021) y las secuencias del virus de Influenza H3 identificadas procedentes de Ecuador durante el período del 2015 al 2022. Se observa que desde el 2015 hasta el 2019, existen secuencias que presentan entre 14 y 31 cambios de aminoácidos.

No obstante, durante los años 2021-2022 existen entre un mínimo de 5 y máximo de 9 cambios de aminoácidos, lo que demuestra una mayor proximidad genética entre las secuencias analizadas y la cepa de referencia vacunal recomendada por la OMS.

Los sitios 8, 22, 38 45, 63, 165, 246, 285, 483, se conservaron en mayor medida entre las muestras analizadas en la región de la HA1 y continuaron expresándose durante el período de estudio. La posición 122 no se identificó en algunas secuencias del 2015 y 2016. Los sitios 126, 133, 144, 158 mostraron mayor variabilidad, probablemente debido a que se encuentran en una zona con mayor presión inmunológica dentro de la hemaglutinina.

La ubicación 126, no se identificó en algunas secuencias del 2016 al 2019, pero si en otras secuencias de los mismos años. Sin embargo, fue detectada en todas las secuencias del 2021 y 2022. La posición 133 se identificó durante el período 2015 al 2022, aunque, se presenta de manera parcial en los años 2017, 2018 y 2019. La posición 144, se detectó en muy pocas muestras del año 2015, al igual que en la cepa de referencia vacunal recomendada para los años 2015 y 2016. Esta mutación 144 no fue identificada posteriormente, lo que sugiere que este cambio de glicosilación se extinguió debido al proceso de evolución viral. Finalmente, la ubicación 158 se ha identificado en los años 2016 al 2019. No obstante, en las secuencias de los años 2021 y 2022 no se observa en ninguna de las muestras de Ecuador ni en la referencia vacunal del 2022-2023 (Anexo 8).

Para el subtipo A/H3N2, se observó una disminución significativa en la evolución del virus durante los dos años siguientes a la pandemia del COVID-19 (2021 – 2022). Esta tendencia podría atribuirse, en gran medida, a la

aparición rápida del virus pandémico SARS-CoV-2 a nivel mundial. Además, las medidas de prevención implementadas a nivel global, como la cuarentena, el aislamiento y las restricciones de movilidad, también podrían haber contribuido a esta disminución en la evolución del virus.

En lo que respecta a Influenza B, los hallazgos son congruentes con los de otros estudios de la región. En estos estudios, se ha observado una alta frecuencia de incompatibilidad de los linajes Yamagata y Victoria de Influenza B, que están incluidos en las vacunas recomendadas, y los linajes que circulan en los países de la región. Esta incompatibilidad se ha observado en varios años de estudio, según Caini 2016 (14).

En el Anexo 9, se ilustran los cambios en los aminoácidos de los virus de Influenza B/Victoria, comparando la secuencia de referencia de la vacuna recomendada por la OMS B/Austria/1359417/2021 con las secuencias obtenidas en Ecuador. Durante los años 2016 y 2017, se observan entre 11 y 13 cambios de aminoácidos. Sin embargo, las secuencias del período 2022-2023 presentan solo entre 2 y 3 diferencias aminoacídicas. Esto sugiere una estrecha relación evolutiva entre las secuencias del 2022, 2023 y la secuencia de la cepa vacunal.

De manera similar, se observa que los sitios de glicosilación de las secuencias identificadas en Ecuador de los años 2022 y 2023 no presentan variaciones en el número de sitios de glicosilación en comparación con la cepa recomendada y los virus circulantes de Influenza B/Victoria.

En lo referente a Influenza B/Yamagata, se puede evidenciar que, a diferencia de los otros subtipos, presenta una menor cantidad de cambios a lo largo del tiempo. Esto refleja una evolución molecular más lenta, con apenas entre 1 y 5 cambios de aminoácidos en todas las secuencias analizadas durante el período de estudio.

Los datos de esta investigación mostraron una media de positividad del 17 % para la Influenza B entre todos los casos positivos de Influenza. Estos hallazgos son similares a los estudios presentados por Caini 2016 (14) y Glezen 2013 (140) en otras regiones. Además, se evidencia un patrón de

circulación más amplia, similar al de otros países tropicales, según lo publicado por Caini en 2018 (15).

Tal como se ha reportado a nivel global y corroborado por los datos virológicos de la OMS, el linaje predominante tanto en Ecuador como a nivel global durante el período de circulación de Influenza B, posterior a la pandemia del SARS-CoV-2, fue el linaje B/Victoria.

Durante el mes noviembre del 2022, se detectaron y notificaron por primera vez casos de Influenza aviar de alta patogenicidad A/H5N1 en Ecuador. Esto llevó a la declaración de un estado de emergencia zoonosanitaria debido al brote.

Este evento tuvo un impacto significativo en la economía del país y a la salud pública. El riesgo radica en la posible transmisión zoonótica del virus entre especies, incluyendo mamíferos, y en su capacidad de reordenarse genéticamente para producir un nuevo virus con potencial pandémico/epidémico.

Después de realizar los análisis filogenéticos se pudo determinar que el clado 2.3.4.4b fue el causante del brote. Esto está en concordancia con lo reportado por la OPS/OMS en varios países de la región y a nivel global.

En el árbol filogenético que ilustra los virus A/H5N1 del clado 2.3.4.4b identificados en Ecuador (Figura 40), sugiere una posible ruta de transmisión de América del Norte hacia América del Sur y entre las especies huésped. Las cepas aisladas en Ecuador se agruparon con las cepas aisladas de pelícanos de Perú y aves silvestres de Chile y están estrechamente relacionadas con las cepas aisladas de pelícanos en Venezuela, lo que confirma la circulación de HPAIV clado 2.3.4.4b en varios países de Sudamérica (100).

Se identificaron mutaciones asociadas con la deriva antigénica en las secuencias de Influenza aviar H5N1 identificadas en Ecuador, las cuales están asociadas al escape mutante, el cambio de especificidad del huésped y la virulencia. Estas mutaciones pueden influir en la dinámica de transmisión y la gravedad del virus, incrementando el riesgo de transmisión accidental de aves a humanos (Anexo 13).

La detección del clado 2.3.4.4b de A/H5N1 en pelícanos de Venezuela, Perú y Chile destaca el papel significativo de las aves silvestres migratorias en la propagación de cepas de Influenza aviar altamente patógenas, ya que se ha documentado su transmisión de Europa a América del Norte. Hasta donde se conoce, este es el primer informe en una revista científica de este clado 2.3.4.4b de Influenza aviar altamente patógena en América del Sur, donde las implicaciones para la salud animal son motivo de preocupación. En el contexto de países de bajos y medianos ingresos, como los de América del Sur, se espera que el impacto de este brote en la producción avícola sea más severo que en los países de altos ingresos debido a la debilidad de los programas de vigilancia. Esto podría afectar potencialmente incluso el suministro de alimentos. Además, es común la presencia de aves domésticas en comunidades rurales desatendidas en Ecuador, especialmente en la provincia donde se declaró el brote (100).

Este escenario potencialmente facilitaría el contacto de humanos con animales infectados, favoreciendo la transmisión zoonótica de Influenza aviar en un contexto de débil sistema de salud pública (100).

Esas comunidades de aves silvestres podrían verse afectadas por la propagación del clado 2.3.4.4b, que es altamente patógeno. Esto se debe a que es bien conocido el papel que desempeñan las aves migratorias silvestres en la transmisión de la gripe aviar.

En resumen, tanto la salud pública humana, la salud animal y la ambiental podrían verse comprometidas por brotes de gripe aviar altamente patógena. Por lo tanto, es recomendable reforzar los programas de vigilancia de la gripe aviar en la región con una perspectiva de una sola salud, incluido el monitoreo centinela de la población de aves silvestres.

La identificación de la mutación H275Y en la secuencia del 2018 identificada como H1/NA/ECUADOR/320250 de la provincia del Guayas, es un hallazgo significativo. Esta mutación está asociada a la resistencia del oseltamivir, un inhibidor de la neuraminidasa que se utiliza comúnmente para tratar y prevenir la influenza.

La presencia de esta mutación subraya la importancia de la vigilancia continua de la resistencia a los medicamentos antivirales. Este hallazgo también resalta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para combatir la influenza, especialmente en regiones donde se ha identificado la resistencia al oseltamivir.

Además, este estudio demuestra la utilidad de la secuenciación genómica para la vigilancia y la identificación de mutaciones de resistencia a los medicamentos. Este enfoque puede ayudar a informar las estrategias de tratamiento y prevención, y a mejorar la respuesta de salud pública a las epidemias de influenza.

7. CONCLUSIONES

Se observó un predominio de los virus de Influenza tipo A, con un 83 % de positividad entre los virus de Influenza identificados y un 17 % para los virus de Influenza B en el período de estudio. El año que mayor porcentaje de positividad identificado para Influenza en el período de estudio, fue en el 2018, predominado por el subtipo A/H1N1 pdm09.

Los picos primarios para Influenza A fueron presentados en la mayoría de las provincias en el mes de enero, y para los virus de Influenza B, durante el mes de febrero. Mientras que los picos secundarios para Influenza A se observaron en el mes de mayo para las localidades del norte y centro de Ecuador, los picos secundarios para las provincias del sur se observaron en agosto. Esto sugiere un comportamiento epidemiológico similar a lo que ocurre en el hemisferio norte, por lo que la formulación de vacunas que se realiza para el HN sería la más adecuada para administrar en Ecuador.

En lo referente a las características genéticas, los virus de Influenza A presentan una mayor variabilidad que los virus de tipo B circulantes. Entre los virus de Influenza A, el subtipo que presentó una mayor diversidad genética fue el subtipo A/H3N2, y los virus con menor variabilidad genética fueron los de Influenza B/Yamagata.

El análisis filogenético de las secuencias disponibles para el estudio de A/H1N1 pdm09 y A/H3N2 procedentes de 5 localidades diferentes de Ecuador, reveló que las provincias del sur tienen el tamaño efectivo de población más grande en comparación con las provincias del norte, lo que probablemente sugiere que las provincias del sur pueden estar actuando como una fuente del virus para su propagación.

Se evidenció una co-circulación de diferentes linajes genéticos de A/H1N1 pdm09 y A/H3N2 en diferentes regiones geográficas del país, así como la co-circulación de los linajes de Influenza B/Victoria y B/Yamagata en la mayoría de años, sin embargo, desde la introducción del SARS-CoV-2 durante la emergencia sanitaria internacional originada por la Pandemia del COVID-19, no se han presentado casos de Influenza B/Yamagata hasta el mes de noviembre del 2023.

En lo referente a los cambios a nivel de aminoácidos y de sitios de glicosilación se puede concluir que, anualmente, debido al proceso normal de evolución viral, presentan cambios de aminoácidos entre las cepas vacunales recomendadas y los subtipos circulantes, no obstante, no se evidencia diferencias entre el número y la ubicación de los sitios de glicosilación entre las secuencias ecuatorianas identificadas y las recomendadas para el período 2023-2024 con los subtipos (A/H1N1 pdm09, A/H3 y el linaje de Influenza B/Victoria).

Entre todas las muestras analizadas, se identificó una muestra del subtipo A/H1N1 pdm09 del año 2018 procedente de la provincia del Guayas con la mutación H275Y en la región de la neuraminidasa, (sustitución de histidina por tirosina en la posición 275), la cual, se encuentra asociada como marcador de resistencia genotípica al oseltamivir (tratamiento utilizado en el país contra la Influenza).

La ausencia de la mutación H275Y en las secuencias restantes puede atribuirse a varios factores. Primero, la generación de mutaciones es un evento aleatorio que depende de la tasa de mutación del virus y de las presiones selectivas presentes. Aunque el virus de la Influenza tiene una tasa de mutación notable, no se ha observado una propagación extensa de esta mutación específica. Además, el uso del antiviral, oseltamivir, no es generalizado en el país debido a que su venta se encuentra restringida a través de recetas médicas. Esto implica que la presión selectiva para la resistencia al medicamento no es alta, lo que resulta en una posible propagación limitada de los virus resistentes.

Sin embargo, es importante destacar que la vigilancia continua de la resistencia a los medicamentos antivirales es crucial para la gestión efectiva de la preparación y respuesta frente a la Influenza.

En lo referente al análisis de formulación vacunal recomendada según el clado identificado, para el subtipo A/H1N1 pdm09, el 2018 fue el año que mayor similitud genética presentó entre los clados circulantes (6B.1); para el subtipo A/H3, fueron los años 2016 (3C.3a) y 2017 (3C.2a).

Para los años 2015 al 2019, existió una discordancia entre la cepa de Influenza B recomendada para la vacuna trivalente del hemisferio norte y los linajes circulantes en el Ecuador, no obstante, para los años 2022 y 2023 fueron 100% concordantes con la cepa vacunal de Influenza B recomendada.

Para el subtipo A/H3N2, se observa en la mayoría de los casos, que los virus circulantes en el Ecuador, se adelantan uno o dos estaciones a las cepas recomendadas en las vacunas, esto considerando que el subtipo A/H3N2 presenta una mayor evolución viral que los otros tipos y subtipos estacionales (141).

En lo referente a los genotipos de Influenza B, existió una diferencia antigénica con la cepa en la vacuna trivalente del hemisferio norte recomendada anualmente durante el período 2016 – 2019; en los correspondiente a los años 2015, y 2022 – 2023, presentaron similitud antigénica con las cepas vacunales recomendadas.

Según los análisis genéticos realizados en varios de los años de estudio, también se pudo observar que existen cepas de los virus de Influenza A/H1N1 en el Ecuador que circulan con una a dos temporadas de anterioridad con respecto a la fecha de introducción de los virus incluidos en la formulación vacunal recomendada.

Ecuador, así como en varios países tropicales, presenta más de un período de circulación de Influenza anual, lo que hace probable, un incremento de cambios tipo *drift*, facilitando los mecanismos naturales de evolución viral para el escape frente a vacunas y a la respuesta inmunológica activa, motivo por el cual, es necesario el fortalecimiento de los análisis en países tropicales y subtropicales en el proceso de selección temprana de posibles candidatos a cepas vacunales.

Es necesario comprender la epidemiología, temporalidad, evolución molecular, biología y la geografía del virus, con la finalidad de desarrollar y aplicar adecuadas estrategias de control, basada en evidencia científica, que permita establecer cuándo vacunar, que formulación aplicar, entre otras medidas de salud pública pertinentes para mitigar su efecto en la población.

El momento de la vacunación y la elección de la más adecuada formulación de la vacuna, se sugiere se encuentre guiada a través de análisis integrales con datos confirmados por laboratorio.

El brote de Influenza aviar causante de la emergencia zoonosaria en el país fue causado por el clado 2.3.4.4b, el cual ha ocasionado un caso de transmisión accidental animal – hombre y presenta un riesgo constante para la salud pública y la economía de los países de la región.

Ante la constante amenaza un posible reordenamiento genético del subtipo A/H5N1 clado 2.3.4.4b que ha causado gran cantidad de casos en aves silvestres, animales de granja y mamíferos, es necesario fomentar y desarrollar estrategias de vigilancia integrales en la interfaz humano – animal con enfoque de Una Salud.

Se recomienda fortalecer los programas de vigilancia genómica con la emisión de reportes oportunos de datos de manera sistemática en los países y en los

Centros Nacionales de Influenza, con la finalidad de aportar con mayor rapidez los clados genéticos circulantes y su relación filogenética con las cepas recomendadas.

Es importante destacar que, en lugar de secuenciar todas las muestras, se deben seleccionar de manera estratégica muestras representativas del brote o del país para realizar la secuenciación, priorizando la calidad sobre la cantidad de muestras analizadas en un período de tiempo establecido. Esta estrategia permite ser más eficiente con los recursos disponibles y útil para comprender la diversidad genética del virus en la población

Se sugiere revisar la ubicación de puestos centinelas y considerar la posibilidad de incluir puestos cercanos a sitios que se hayan detectado casos de Influenza animal o se considere zonas de alto riesgo de transmisión de Influenza zoonótica, con la finalidad de captar de manera temprana, posibles casos humanos de una nueva cepa emergente que pueda propagarse de persona a persona con potencial riesgo pandémico.

8. REFERENCIAS

1. Ferguson, N. M., Galvani, A. P., & Bush, R. M. (2003). Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature*, 422(6930), 428–433.
2. Viboud, C., & Boëlle, P. Y. (2004). Risk factors of influenza transmission in households. *British Journal of General Practice*, 54(506): 684–689.
3. Tamerius, J., & Nelson, M. I. (2011). Global influenza seasonality: reconciling patterns across temperate and tropical regions. *Environmental Health Perspectives*, 119(4): 439–445.
4. Nair, H., Brooks, W., Katz, M., Roca, A., Berkley, J., Madhi, S., et al. (2011). Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 378(9807), 1917–1930.
5. Morris, D. E., Cleary, D. W., & Clarke, S. C. (2017). Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1041.
6. Iuliano, A., Roguski, K., et al. (2017). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*, 391(10127):1285-1300.
7. Wolff, T., & Veit, M. (2021). Influenza B, C and D Viruses (Orthomyxoviridae). Elsevier, *Encyclopedia of Virology*, 561–574.
8. Nelson, M.I., & Holmes E.C. (2007). The evolution of epidemic influenza. *Nature*. p.196.
9. Tong S., Zhu X., Li Y., et al.(2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*; 9(10):e1003657.
10. Knobler, M., Mack, A., Mahmoud, A., & Lemon, S.M. (2005). *The Story of Influenza*. NIH.GOV. National Academies Press (US).

11. WHA58.5 (2005). Strengthening pandemic-influenza preparedness and response. Retrieved July 8, 2023 from https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_5-en.pdf
12. Baldo, V., Bertoncetto, C., Cocchio, S., Fonzo, M., Pillon, P., Buja, A., et al. (2016). The new pandemic influenza A/(H1N1)pdm09 virus: is it really “new”? *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*; 57(1):E19-22.
13. Bruno A., (2013). Subtipos del virus influenza A circulantes en Ecuador durante mayo - diciembre del año 2009 (Tesis de maestría). Universidad de Guayaquil.
14. Caini, S., Andrade, W., Badur, S., Balmaseda, A., Barakat, A., Bella, A., et al. (2016). Temporal Patterns of Influenza A and B in Tropical and Temperate Countries: What Are the Lessons for Influenza Vaccination?, *PLOS ONE*; 11(3):e0152310–e0152310.
15. Caini, S., Kroneman, M., Wieggers, T. A., Paget, J. (2018). Clinical characteristics and severity of influenza infections by virus type, subtype, and lineage: A systematic literature review. *Influenza and Other Respiratory Viruses*; 12(6):780–792.
16. Durand, L. & Cheng, P. Y. (2016). Timing of influenza epidemics and vaccines in the American tropics; *Influenza and Other Respiratory Viruses*; 2002–2008, 2011-2014, 10(3):170-5.
17. MapChart. (2023). MapChart. Retrieved from <https://www.mapchart.net/americas-detailed.html>
18. Potter, C. W. (2001). A history of influenza. *Journal of Applied Microbiology*; 91(4):572–579.
19. Athukorala, P. & Athukorala, C. (2022). *The 1918–20 Influenza Pandemic*. Cambridge University Press.

20. CDC.(2023). Influenza Historic Timeline. Retrieved from <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/pandemic-timeline-1930-and-beyond.htm>
21. Saunders-Hastings, P., & Krewski, D. (2016). Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens*, 5(4), 66.
22. Dawood, F. S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M. W., Lindstrom, S., Garten, R. J., et al. (2009). Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *New England Journal of Medicine*, 360(25), 2605–2615.
23. Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., et al. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459(7250), 1122–1125.
24. Mena, I., Nelson, M. I., Quezada-Monroy, F., Dutta, J., Cortes-Fernández, R., Lara-Puente, J. H., et al. (2016). Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *eLife*, 5(e16777).
25. USDA APHIS | Avian Influenza. (2013). Usda.gov. <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-disease-information/avian/avian-influenza/ai>.
26. WOA - World Organisation for Animal Health. (2023). Avian Influenza. Disponible en: <https://www.woah.org/en/disease/avian-influenza/>
27. CDC. (2023). Reports of Avian Influenza (AI) “Bird Flu” Outbreaks Increased Globally from 2013–2022. Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2022-2023/avian-influenza-outbreaks-increased-globally.htm>
28. Ozawa, M., & Kawaoka, Y. (2013). Cross Talk Between Animal and Human Influenza Viruses. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 21–42.

29. Restivo V et al (2017). Influenza vaccine effectiveness among high-risk groups: A systematic literature review and meta-analysis of case-control and cohort studies. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*; 14(3):724–735.
30. CDC (2023). 2021-2022 Flu Season Summary [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention; [actualizado el 12 de enero de 2023; consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/season/faq-flu-season-2021-2022.htm>
31. WHO (2023). Recommendations announced for influenza vaccine composition for the 2023-2024 northern hemisphere influenza season [Internet]. World Health Organization; [actualizado el 24 de febrero de 2023; consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/24-02-2023-recommendations-announced-for-influenza-vaccine-composition-for-the-2023-2024-northern-hemisphere-influenza-season>
32. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) (2023). Who.int; World Health Organization: WHO [Internet]. [actualizado el 9 de octubre de 2023; consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system>
33. CDC (2023). Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention; consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/summary/summary-recommendations.htm>
34. Ehrlich-Institut. (2022). Influenza Season 2022/23 – First Influenza Vaccine Batches Released - Paul- [Www.pei.de](http://www.pei.de). <https://www.pei.de/EN/newsroom/hp-news/2022/220824-influenza-season-2022-2023-first-batches-vaccines-released.html>

35. Bruno,A., Goñi,N., & Cristina,J.(2023). Spatial,temporal and evolutionary insight into seasonal epidemic Influenza A virus strains near the equatorial line: The case of Ecuador.Virus Research;326:199051.
36. WHO. Vaccine in tropics and subtropics.(2016). WHO.int; World Health Organization: WHO; Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/vaccines/vaccine-in-tropics-and-subtropics>
37. WHO. (2023). Who.int. Disponible en:
<https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2023-2024-northern-hemisphere-influenza-season>
38. WHO. (2023). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2024 southern hemisphere influenza season. Disponible en:<https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2024-southern-hemisphere-influenza-season>.
39. Goñi N., Fajardo A., Moratorio G., Colina R., and Cristina J., (2009). Modeling gene sequences over time in 2009 H1N1 Influenza A Virus Populations Virology Journal; 6(215):1–11.
40. Zheng W & Tao YJ (2013). Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex FEBS Letters; 587(8):1206–1214.
41. Bouvier NM & Palese P (2008). The biology of influenza viruses Vaccine; 26(Suppl 4):D49–D53.
42. Mercier, L. (2023). Alphainfluenzavirus. ViralZone. Recuperado de <https://viralzone.expasy.org/6>
43. Colder L & Rosenthal P (2010). Structural organization of filamentous influenza A virus Proceedings of the National Academy of Sciences;107(23):10685–10687.

44. Li X et al (2021). Packaging signal of influenza A virus *Virology Journal*; 18(1):1–13.
45. Bourmakina SV & García-Sastre A (2005). The Morphology and Composition of Influenza A Virus Particles Are Not Affected by Low Levels of M1 and M2 Proteins in Infected Cells *Journal of Virology*; 79(12):7926–7932.
46. Veit M & Thaa B (2011). Association of Influenza Virus Proteins with Membrane Rafts *Advances in Virology*; 2011:1–14.
47. CDC. (2023). Cdc.gov. Disponible en:
<https://www.cdc.gov/flu/images/influenza-virus-fulltext.jpg>
48. Watanabe S et al (2003). Influenza B Virus BM2 Protein Is Transported through the trans- Golgi Network as an Integral Membrane Protein *Journal of Virology*; 77(19):10630–10637.
49. Biology LibreTexts. (2017, Junio 24). 9.9C: Replicative Cycle of Influenza A. Recuperado de
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Boundless\)/09%3A_Viruses/9.09%3A_Negative-Strand_RNA_Viruses_in_Animals/9.9C%3A_Replicative_Cycle_of_Influenza_A](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/09%3A_Viruses/9.09%3A_Negative-Strand_RNA_Viruses_in_Animals/9.9C%3A_Replicative_Cycle_of_Influenza_A)
50. Lamb, R. A., & Krug, R. M. (2001). Orthomixoviridae: the viruses and their replication. En D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (4^a ed., pp. 1487-1531). Lippincott Williams & Wilkins.
51. Nelson, M. I., & Vincent, A. L. (2012). The evolution of novel reassorted A/H3N2 influenza viruses in North American swine and humans, 2009-2011. *Journal of Virology*, 86(16), 8872–8888.

52. Stevens, J., & Wilson, I. A. (2006). Glycan Microarray Analysis of the Hemagglutinins from Modern and Pandemic Influenza Viruses Reveals different Receptors Specificities. *Journal of Molecular Biology*, 355(5), 1143–1150.
53. Miyamoto, S., Nakano, M., Morikawa, T., Hirabayashi, A., Tamura, R., Fujita, Y., et al. (2022). Migration of Influenza Virus Nucleoprotein into the Nucleolus Is Essential for Ribonucleoprotein Complex Formation. *mBio*, 13(1), e03315-21.
54. Hutchinson, E. C., & Fodor, E. (2013). Transport of the Influenza Virus Genome from Nucleus to Nucleus. *Viruses*, 5(10), 2424–2446.
55. Nayak, D., Hui, E., & Barman, S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research*; 106(2):147–165.
56. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., & Daniels, R.D.(2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Frontiers in Immunology*; 9:1–20.
57. McAuley, J.L., Gilbertson, B., Sanja Trifkovic, S., Brown, L.E., & McKimm-Breschkin, J.L.(2019). Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in Microbiology*; 10:1–14.
58. Zhao X-N, Zhang H-J, Li D, Zhou J-N, Chen Y-Y, Sun Y-H, et al. (2020) Whole-genome sequencing reveals origin and evolution of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Lincang, China, from 2014 to 2018. *PLoS ONE* 15(6): e0234869.
59. Al-Khatib, H. A., Gallouzi, I., & Yassine, H. M. (2019). Epidemiological and genetic characterization of pH1N1 and H3N2 influenza viruses circulated in MENA region during 2009–2017. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–14.

60. Mukherjee, A., Nayak, M., Dutta, S., Panda, S., Biswa Ranjan Satpathi, & Mamta Chawla-Sarkar. (2016). Genetic Characterization of Circulating 2015 A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses from Eastern India. PLOS ONE, 11(12), e0168464–e0168464.
61. Davlin, S. L., Blanton, L., Kniss, K., Mustaquim, D., Smith Sj, Kramer, N., et al., (2016). Influenza Activity — United States, 2015–16 Season and Composition of the 2016–17 Influenza Vaccine. Morbidity and Mortality Weekly Report, 65(22), 567–575.
62. WHO. (2017). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017 southern hemisphere influenza season. Who.int; World Health Organization: WHO [Internet]; consultado el 05 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphere-recommendation2017/201609_recommendation.pdf?sfvrsn=382ce080_13&download=true
63. WHO. (2018). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018 southern hemisphere influenza season. Who.int; World Health Organization: WHO [Internet]; consultado el 05 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphererecommendation2018/201709_recommendation.pdf?sfvrsn=ce02fcd_13&download=true
64. Xu, X., Blanton, L., Abd, I., Alabi, N., Barnes, J., Biggerstaff, et al. (2019). Update: Influenza Activity in the United States During the 2018–19 Season and Composition of the 2019–20 Influenza Vaccine. Morbidity and Mortality Weekly Report, 68(24), 544–551. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6824a3>

65. WHO. (2019). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 - 2020 northern hemisphere influenza season. Who.int; World Health Organization: WHO [Internet]; consultado el 05 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-northern-hemisphere-recommendation-2019-2020/201902-recommendation.pdf?sfvrsn=7aa5b685_13&download=true
66. CDC. (2019). Influenza Activity in the United States during the 2022–2023 Season and Composition of the 2023–24 Influenza Vaccine. Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/spotlights/2023-2024/22-23-summary-technical-report.htm>
67. ECDC. (2023). Influenza virus characterization Summary report, Europe, February 2023. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Influenza-characterisation-February-2023.pdf>
68. WHO. (2022). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2022-2023 northern hemisphere influenza season. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2022-2023-northern-hemisphere-influenza-season>
69. WHO. (2021). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2022 southern hemisphere influenza season. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2022-southern-hemisphere-influenza-season>
70. WHO. (2022). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2023 southern hemisphere influenza season. <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2023-southern-hemisphere-influenza-season>

71. Danuta M Skowronski, Siobhan Leir, Suzana Sabaiduc, Catharine Chambers, Macy Zou, Caren Rose, et al. (2022). Influenza Vaccine Effectiveness by A(H3N2) Phylogenetic Subcluster and Prior Vaccination History: 2016–2017 and 2017–2018 Epidemics in Canada, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 225, Issue 8, 15 April 2022, Pages 1387–1398
72. WHO. (2015). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2015-2016-northern-hemisphere-influenza-season>
73. WHO. (2016). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season. Disponible en: Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season (who.int)
74. ECDC. (2016). Influenza virus characterisation Summary, Europe, September 2016. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterisation-summary-europe-september-2016>
75. CDC. Update: Influenza Activity in the United States During the 2017–18 Season and Composition of the 2018–19 Influenza Vaccine. (2018). Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6722a4.htm>
76. Flannery, B., Kondor, R., Chung, J. R., Manjusha Gaglani, Reis, M., Zimmerman, R. K., Mary Patricia Nowalk, Jackson, et al. (2019). Spread of Antigenically Drifted Influenza A(H3N2) Viruses and Vaccine Effectiveness in the United States During the 2018–2019 Season. *The Journal of Infectious Diseases*, 221(1), 8–15.
77. ECDC. (2021). Influenza virus characterization, December 2020. Disponible en: Influenza virus characterization, December 2020 (europa.eu)

78. Melidou A, Ködmön C, Nahapetyan K, et al. (2022). Influenza returns with a season dominated by clade 3C.2a1b.2a.2 A(H3N2) viruses, WHO European Region, 2021/22. Euro Surveillace: Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 2022 Apr;27(15).
79. Bolton, M. J., Ort, J. T., McBride, R., Swanson, N. J., Wilson, J., Awofolaju, et al. (2022). Antigenic and virological properties of an H3N2 variant that continues to dominate the 2021–22 Northern Hemisphere influenza season. Cell Reports, 39(9), 110897–110897.
80. WHO. (2021). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2021- 2022 northern hemisphere influenza season. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/202102_recommendation.pdf
81. Соминина, А. А., Danilenko, D., Andrey Komissarov, Pisareva, M., Artem Fadeev, Коновалова, et al. (2023). Assessing the Intense Influenza A(H1N1)pdm09 Epidemic and Vaccine Effectiveness in the Post-COVID Season in the Russian Federation. Viruses, 15(8), 1780–1780.
82. WHO. (2023). Influenza (Seasonal). Who.int; World Health Organization: WHO. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
83. Lei, N., Wang, H., Zhang, Y., Zhao, J., Zhong, Y., Wang, et al. (2019). Molecular evolution of influenza B virus during 2011–2017 in Chaoyang, Beijing, suggesting the free influenza vaccine policy. Scientific Reports, 9(1), 1–11.
84. Reina J. (2022). [The Victoria and Yamagata Lineages of Influenza B Viruses, unknown and undervalued]. Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia. 2022 Jun;35(3):231-235.

85. Neli Korsun, Svetla Angelova, Ivelina Trifonova, Georgieva, I., Iren Tzotcheva, Sirma Mileva, et. al (2019). Predominance of influenza B/Yamagata lineage viruses in Bulgaria during the 2017/2018 season. *Epidemiology and Infection*, 147.
86. ECDC. (2018). Seasonal influenza, 2017–2018. Annual Epidemiological Report for 2017. Disponible en AER for 2017 (europa.eu).
87. Shu, B., Kirby, M. K., Warnes, C., Sessions, W., Davis, W. G., Liu, J., et. al (2020). Detection and discrimination of influenza B Victoria lineage deletion variant viruses by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(41).
88. ECDC. (2020). Seasonal influenza 2019-2020 Annual Epidemiological Report. Disponible en: AER for 2019 seasonal influenza (europa.eu)
89. Xie, H., Xiang, R., Wan, H. J., Plant, E. P., Radvák, P., Košíková, M., et. al (2020). Reduced Influenza B–Specific Postvaccination Antibody Cross-reactivity in the B/Victoria Lineage–Predominant 2019/20 Season. *Clinical Infectious Diseases*, 72(11), e776–e783. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1481>
90. WHO. (2020). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2020-2021 northern hemisphere influenza season. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2020-2021-northern-hemisphere-influenza-season>.
91. ECDC. (2022). Seasonal influenza - Annual Epidemiological Report for 2022/2023. Disponible en: Seasonal influenza - Annual Epidemiological Report for 2022/2023 (europa.eu)
92. Langat, P., Raghwani, J., Dudas, G., Bowden, T. A., Edwards, S. S., Gall, A., et al. (2017). Genome-wide evolutionary dynamics of influenza B viruses on a global scale. *PLOS Pathogens*;13(12):e1006749.

93. Thornlow, D. N., Macintyre, A. N., Oguin, T. H., Karlsson, A., Stover, E., Lynch, H. E., Sempowski, G. D., & Schmidt, A. (2021). Altering the Immunogenicity of Hemagglutinin Immunogens by Hyperglycosylation and Disulfide Stabilization. *Frontiers in Immunology*, 12.
94. CDC. (2015-2023). Summary of Influenza Virus Epidemiology and Virus Characteristics.
95. Dhingra, M. S., Artois, J., Dellicour, S., Lemey, P., Dauphin, G., Von Dobschuetz, S., et al. (2018). Geographical and historical patterns in the emergences of novel highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5 and H7 viruses in poultry. *Frontiers in Veterinary Science*; 5:84.
96. Cui P, Shi J, Wang C, et al. Global dissemination of H5N1 influenza viruses bearing the clade 2.3.4.4b HA gene and biologic analysis of the ones detected in China. *Emerging Microbes & Infections*. 2022 Dec;11(1):1693-1704.
97. CDC. (2023). Emergence and Evolution of H5N1 Bird Flu. Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/communication-resources/bird-flu-origin-infographic.html>
98. Günther, A., Krone, O., Svansson, V., Pohlmann, A., King, J., Hallgrímsson, G. T., et al. (2022). Iceland as stepping stone for spread of highly pathogenic avian influenza virus between Europe and North America. *Emerging Infectious Diseases*; 28(12):2383–2388.
99. Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) (2023). Alerta Epidemiológica: brotes de Influenza Aviar e infección humana causada por influenza A(H5). Implicaciones para la salud pública en Región de las Américas [Internet]. OPS/OMS; [actualizado el 11 de enero de 2023; consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-brotes-influenza-aviar-e-infeccion-humana-causada-por-influenza>

100. Bruno, A., Alfaro-Núñez, A., Mora, D., Armas, R., Olmedo, M., Garcés, J., Muñoz-López, G., & García-Bereguain, M. A. (2023). Phylogenetic analysis reveals that the H5N1 avian influenza A outbreak in poultry in Ecuador in November 2022 is associated to the highly pathogenic clade 2.3.4.4b. *International Journal of Infectious Diseases*; 133:27–30.
101. Agrocalidad. 2023. Influenza Aviar. Disponible en: <https://influenzaviar.agrocalidad.gob.ec/>
102. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2023). H5N1 Bird Flu: Current Situation Summary [Internet]. CDC; [actualizado el 9 de octubre de 2023; consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/avian-flu-summary.htm>
103. Bruno, A., Alfaro-Núñez, A., de Mora, D., Armas, R., Olmedo, M., Garcés, J., et al. (2023). First case of human infection with highly pathogenic H5 avian Influenza A virus in South America: A new zoonotic pandemic threat for 2023? *Journal of Travel Medicine*, taad032, Volume 30, Issue 5.
104. Bruno, A. (2023). Título del proyecto de titulación como requisito previo para la Maestría en Biología Computacional. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado el 10 de octubre de 2023, de http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/21393/TRABAJO_FINAL_TITULACION_ALFREDO_BRUNO.pdf?sequence=1
105. Flunet. (2023). Who.int. <https://www.who.int/tools/flunet>
106. Khare, S., et al (2021) GISAID's Role in Pandemic Response. *China CDC Weekly*, 3(49): 1049-1051. doi: 10.46234/ccdcw2021.255 PMID: 8668406
107. CDC. (2022). Protocolo del CDC para el RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) para la Detección y Caracterización de Influenza-Influenza A e Influenza B.

108. Alonso, W. J., & McCormick, B. J. (2012). EPIPOI: a user-friendly analytical tool for the extraction and visualization of temporal parameters from epidemiological time series. *BMC Public Health*; 12(1):982.
109. Wessa, P. (2023). Wessa.net - Free Statistics and Forecasting Software (Calculators) v.1.2.1 [Internet]. Wessa.net; [consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.wessa.net/>
110. Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98. Disponible en: BioEdit | Computing for Arts + Sciences (unt.edu)
111. Rozewicki, Li, Amada, Standley, Katoh 2019 (Nucleic Acids Research 47:W5-W10) MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. Disponible en: MAFFT - a multiple sequence alignment program (cbrc.jp)
112. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*; 20(4):1160–1166.
113. Müller, N. F., Rasmussen, D. A., & Stadler, T. (2018). MASCOT: parameter and state inference under the marginal structured coalescent approximation. *Bioinformatics*; 34(17):i732–i740.
114. Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, et al. (2019). BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*;15(4):e1006650.
115. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., Von Haeseler, A., & Minh, B.Q. (2016). IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*; 44(W1):W232–W235.

116. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G and Suchard MA (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. syy032.
117. Drummond AJ & Rambaut A (2007) "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.
118. Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. (2021). Ed.ac.uk. <http://tree.bio.ed.ac.uk/>
119. Tamura, Stecher, Kumar (2021). MEGA XI: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 11. Disponible en: Home (megasoftware.net)
120. Aksamentov, I., Roemer, C., Hodcroft, E. B., & Neher, R. A., (2021). Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *Journal of Open Source Software*, 6(67), 3773. Disponible en: <https://clades.nextstrain.org/>
121. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
122. Farahpour, F., Saeedghalati, M., & Hoffmann, D. (2022). MullerPlot: An R package for generating Muller Plots
<https://cran.r-project.org/web/packages/MullerPlot/vignettes/MullerPlot.html>
123. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
124. Sheu, T.G et al (2008). Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52(9):3284–3292.

125. Finley, J.M et al (1999). Novel aromatic inhibitors of influenza virus neuraminidase make selective interactions with conserved residues and water molecules in the active site. *Journal of Molecular Biology*; 293(5):1107–1119.
126. Larsson, A. (2014). AliView - Alignment Viewer and Editor [Internet]. Ormbunkar.se; [consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://ormbunkar.se/aliview/>
127. BII Flusurver - Prepared for the next wave. (2023). BII Flusurver [Internet]. A-Star.edu.sg; [consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://flusurver.bii.a-star.edu.sg/>
128. Goñi, N. (2011). Variabilidad Genética y Evolución Molecular del Virus de Influenza A en Uruguay (Tesis doctoral). Universidad de la República.
129. Hirve, S. (2015). Seasonal influenza vaccine use in low and middle income countries in the tropics and subtropics: a systematic review [Internet]. World Health Organization: WHO [consultado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/181487/9789241565097_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
130. Alonso, W. J., Yu, C., Viboud, C., et al. (2015). A global map of hemispheric influenza vaccine recommendations based on local patterns of viral circulation. *Scientific Reports*; 5:17214.
131. De Mello, W. A., De Paiva, T. M., Ishida, M. A., et al. (2009). The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the Brazilian case examined under alternative scenarios. *PLoS One*; 4(4):e5095.
132. Kitler, M. E., Gavinio, P., & Lavanchy, D. (2002). Influenza and the work of the World Health Organization. *Vaccine*; 20(Suppl 4):S5–S14.

133. Richard,S.A., Viboud,C., Miller,M.A.(2010). Evaluation of southern hemisphere influenza vaccine recommendations. *Vaccine*; 28(19):2693–2699.
134. Tamerius,J.D et al (2013). Environmental predictors of seasonal influenza epidemics across temperate and tropical climates. *PLoS Pathogens*;9(3):e1003194.
135. Suntronwong,N et al (2020). Climate factors influence seasonal influenza activity in Bangkok,Thailand.*PLoS One*;15(9):e0239729.
136. N'gattia,A.K et al (2016). Effects of climatological parameters in modeling and forecasting seasonal influenza transmission in Abidjan,Cote d'Ivoire.*BMC Public Health*;16:972.
137. Soebiyanto,R.P et al (2014). The role of temperature and humidity on seasonal influenza in tropical areas: Guatemala,El Salvador and Panama,2008–2013.*PLoS One*;9(6):e100659.
138. Pentiah,K et al (2014). N-Linked glycans on influenza A H3N2 hemagglutinin constrain binding of host antibodies,but shielding is limited.*Glycobiology*;25(1):124–132.
139. Arinaminpathy,N., & Grenfell,B.(2010). Dynamics of Glycoprotein Charge in the Evolutionary History of Human Influenza.*PLoS ONE*;5(12):e15674.
140. Paul Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J. The burden of influenza B: a structured literature review. *American Journal of Public Health*. 2013 Mar;103(3):e43-51. PMID: 23327249.
141. Huang,Z.-Z et al (2017). Charged amino acid variability related to N-glycosylation and epitopes in A/H3N2 influenza: Hemagglutinin and neuraminidase.*PLOS ONE*;12(7):e0178231.

9. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias genéticas de Ecuador región Hemaglutinina utilizadas en el análisis de coalescencia de Ecuador.

Accession number	Name	Province of isolation	Date of Isolation
EPI_ISL_233034	A/ECUADOR/233034/2016	Pichincha	02-06-16
EPI_ISL_233036	A/ECUADOR/233036/2016	Pichincha	27-04-16
EPI_ISL_233037	A/ECUADOR/233037/2016	Pichincha	04-05-16
EPI_ISL_233039	A/ECUADOR/233039/2016	Manabí	02-04-16
EPI_ISL_233040	A/ECUADOR/233040/2016	Pichincha	10-06-16
EPI_ISL_233510	A/ECUADOR/233510/2016	Guayas	24-03-16
EPI_ISL_233512	A/ECUADOR/233512/2016	Manabí	29-03-16
EPI_ISL_233513	A/ECUADOR/233513/2016	Chimborazo	06-06-16
EPI_ISL_236829	A/ECUADOR/236829/2016	Chimborazo	26-04-16
EPI_ISL_273797	A/ECUADOR/273797/2017	Pichincha	27-02-17
EPI_ISL_299992	A/ECUADOR/299992/2018	Pichincha	09-01-18
EPI_ISL_299994	A/ECUADOR/299994/2018	Chimborazo	10-01-18
EPI_ISL_299995	A/ECUADOR/299995/2018	Pichincha	03-01-18
EPI_ISL_299996	A/ECUADOR/299996/2017	Pichincha	22-12-17
EPI_ISL_299997	A/ECUADOR//299997/2017	Pichincha	27-12-17
EPI_ISL_300075	A/ECUADOR/300075/2018	Manabí	10-01-18
EPI_ISL_300077	A/ECUADOR/300077/2018	Pichincha	02-01-18
EPI_ISL_300078	A/ECUADOR/300078/2017	Pichincha	23-12-17
EPI_ISL_300079	A/ECUADOR/300079/2018	Pichincha	05-01-18
EPI_ISL_300080	A/ECUADOR/300080/2018	Pichincha	11-01-18
EPI_ISL_300081	A/ECUADOR/300081/2018	Pichincha	02-01-18
EPI_ISL_300082	A/ECUADOR/300082/2017	Pichincha	27-12-17
EPI_ISL_300084	A/ECUADOR/300084/2018	Guayas	05-01-18
EPI_ISL_300085	A/ECUADOR/300085/2018	Pichincha	05-01-18
EPI_ISL_300086	A/ECUADOR/300086/2017	Pichincha	24-12-17
EPI_ISL_300087	A/ECUADOR/300087/2018	Azuay	12-01-18
EPI_ISL_302838	A/ECUADOR/302838/2017	Pichincha	28-12-17
EPI_ISL_302974	A/ECUADOR/302974/2018	Pichincha	10-01-18
EPI_ISL_302977	A/ECUADOR/302977/2018	Azuay	06-01-18
EPI_ISL_302980	A/ECUADOR/302980/2018	Manabí	03-01-18
EPI_ISL_314049	A/ECUADOR/314049/2017	Azuay	12-12-17
EPI_ISL_320	A/ECUADOR/320/2018	Pichincha	01-04-18
EPI_ISL_320242	A/ECUADOR/320242/2018	Pichincha	02-06-18
EPI_ISL_320243	A/ECUADOR/320243/2018	Guayas	01-03-18
EPI_ISL_320245	A/ECUADOR/320245/2018	Pichincha	07-02-18
EPI_ISL_320246	A/ECUADOR/320246/2018	Chimborazo	17-02-18
EPI_ISL_320248	A/ECUADOR/320248/2018	Guayas	13-03-18
EPI_ISL_320249	A/ECUADOR/320249/2018	Guayas	12-03-18
EPI_ISL_320250	A/ECUADOR/320250/2018	Guayas	06-03-18
EPI_ISL_320251	A/ECUADOR/320251/2018	Guayas	19-03-18

EPI_ISL_320252	A/ECUADOR/320252/2018	Pichincha	03-07-18
EPI_ISL_320253	A/ECUADOR/320253/2018	Guayas	12-03-18
EPI_ISL_320254	A/ECUADOR/320254/2018	Guayas	19-03-18
EPI_ISL_340400	A/ECUADOR/340400/2018	Guayas	12-03-18
EPI_ISL_346035	A/ECUADOR/346035/2018	Guayas	09-12-18
EPI_ISL_349808	A/ECUADOR/349808/2018	Guayas	13-12-18
EPI_ISL_349810	A/ECUADOR/349810/2019	Chimborazo	13-01-19
EPI_ISL_402567	A/ECUADOR/402567/2019	Guayas	21-11-19
EPI_ISL_402568	A/ECUADOR/402568/2019	Guayas	20-11-19
EPI_ISL_402569	A/ECUADOR/402569/2019	Guayas	27-11-19
EPI_ISL_402570	A/ECUADOR/402570/2019	Pichincha	21-11-19
EPI_ISL_402571	A/ECUADOR/402571/2019	Pichincha	28-11-19
EPI_ISL_402572	A/ECUADOR/402572/2019	Pichincha	28-11-19
EPI_ISL_404480	A/ECUADOR/404480/2019	Azuay	30-11-19
EPI_ISL_404	A/ECUADOR/404/2019	Pichincha	27-11-19
EPI_ISL_404482	A/ECUADOR/404482/2019	Pichincha	18-11-19
EPI_ISL_404484	A/ECUADOR/404484/2019	Pichincha	14-11-19
EPI_ISL_404489	A/ECUADOR/404489/2019	Pichincha	30-10-19
EPI_ISL_404837	A/ECUADOR/404837/2019	Guayas	12-11-19
EPI_ISL_404838	A/ECUADOR/404838/2019	Guayas	04-09-19
EPI_ISL_404840	A/ECUADOR/404840/2019	Pichincha	07-09-19
EPI_ISL_404	A/ECUADOR/404/2019	Pichincha	07-09-19
EPI_ISL_409522	A/ECUADOR/409522/2019	Azuay	26-11-19
EPI_ISL_637232	A/ECUADOR/637232/2020	Guayas	06-02-20
EPI_ISL_637233	A/ECUADOR/637233/2020	Guayas	09-01-20
EPI_ISL_637234	A/ECUADOR/637234/2020	Manabí	16-01-20
EPI_ISL_637235	A/ECUADOR/637235/2020	Guayas	15-01-20
EPI_ISL_637239	A/ECUADOR/637239/2019	Pichincha	27-12-19
EPI_ISL_637240	A/ECUADOR/637240/2019	Pichincha	27-12-19
EPI_ISL_637	A/ECUADOR/637/2020	Guayas	22-01-20
EPI_ISL_637245	A/ECUADOR/637245/2020	Guayas	09-01-20
EPI_ISL_637243	A/ECUADOR/637243/2020	Guayas	08-01-20
EPI_ISL_402491	A/ECUADOR/402491/2019	Pichincha	15-01-19
EPI_ISL_355743	A/ECUADOR/355743/2018	Chimborazo	04-12-18
EPI_ISL_355742	A/ECUADOR/355742/2019	Pichincha	10-01-19
EPI_ISL_355741	A/ECUADOR/355741/2018	Pichincha	20-11-18
EPI_ISL_355740	A/ECUADOR/355740/2018	Pichincha	20-12-18
EPI_ISL_355739	A/ECUADOR/355739/2018	Pichincha	26-12-18
EPI_ISL_355738	A/ECUADOR/355738/2018	Chimborazo	07-12-18
EPI_ISL_355737	A/ECUADOR/355737/2018	Chimborazo	04-01-19
EPI_ISL_355736	A/ECUADOR/355736/2019	Chimborazo	03-01-19
EPI_ISL_355735	A/ECUADOR/355735/2018	Pichincha	27-12-18
EPI_ISL_353709	A/ECUADOR/353709/2019	Pichincha	11-01-19
EPI_ISL_353708	A/ECUADOR/353708/2019	Pichincha	20-01-19
EPI_ISL_349956	A/ECUADOR/349956/2019	Guayas	10-01-19
EPI_ISL_349898	A/ECUADOR/349898/2019	Pichincha	14-01-19
EPI_ISL_349761	A/ECUADOR/349761/2019	Chimborazo	12-01-19

EPI_ISL_347939	A/ECUADOR/347939/2019	Pichincha	03-01-19
EPI_ISL_347936	A/ECUADOR/347936/2019	Pichincha	04-01-19
EPI_ISL_347935	A/ECUADOR/347935/2019	Pichincha	13-01-19
EPI_ISL_347933	A/ECUADOR/347933/2019	Azuay	10-01-19
EPI_ISL_347929	A/ECUADOR/347929/2018	Pichincha	16-12-18
EPI_ISL_347927	A/ECUADOR/347927/2019	Pichincha	16-01-19
EPI_ISL_320332	A/ECUADOR/320332/2018	Pichincha	16-03-18
EPI_ISL_320331	A/ECUADOR/320331/2018	Chimborazo	26-05-18
EPI_ISL_320330	A/ECUADOR/320330/2018	Chimborazo	21-04-18
EPI_ISL_320329	A/ECUADOR/320329/2018	Chimborazo	20-03-18
EPI_ISL_299991	A/ECUADOR/299991/2018	Pichincha	09-01-18
EPI_ISL_299890	A/ECUADOR/299890/2017	Pichincha	17-12-17
EPI_ISL_277506	A/ECUADOR/277506/2017	Guayas	26-02-17
EPI_ISL_277505	A/ECUADOR/277505/2017	Guayas	28-03-17
EPI_ISL_275726	A/ECUADOR/275726/2017	Guayas	07-03-17
EPI_ISL_275725	A/ECUADOR/275725/2017	Chimborazo	07-04-17
EPI_ISL_275724	A/ECUADOR/275724/2017	Chimborazo	13-04-17
EPI_ISL_273640	A/ECUADOR/273640/2017	Pichincha	23-04-17
EPI_ISL_194962	A/ECUADOR/194962/2015	Cañar	06-06-15
EPI_ISL_272896	A/ECUADOR/272896/2017	Pichincha	04-03-17
EPI_ISL_272893	A/ECUADOR/272893/2017	Guayas	27-01-17
EPI_ISL_272892	A/ECUADOR/272892/2017	Guayas	28-03-17
EPI_ISL_272891	A/ECUADOR/272891/2017	Pichincha	25-02-17
EPI_ISL_272888	A/ECUADOR/272888/2017	Cañar	21-03-17
EPI_ISL_272886	A/ECUADOR/272886/2017	Pichincha	18-05-17
EPI_ISL_272885	A/ECUADOR/272885/2017	Pichincha	22-03-17
EPI_ISL_232989	A/ECUADOR/232989/2016	Guayas	16-03-16
EPI_ISL_232988	A/ECUADOR/232988/2016	Guayas	10-03-16
EPI_ISL_232986	A/ECUADOR/232986/2016	Cañar	21-04-16
EPI_ISL_32553	A/ECUADOR/32553/2016	Chimborazo	22-05-16
EPI_ISL_232542	A/ECUADOR/232542/2016	Chimborazo	21-05-16
EPI_ISL_201207	A/ECUADOR/201207/2015	Cañar	01-06-15
EPI_ISL_200684	A/ECUADOR/200684/2015	Pichincha	08-05-15
EPI_ISL_200683	A/ECUADOR/200683/2015	Pichincha	05-02-15
EPI_ISL_200682	A/ECUADOR/200682/2015	Cañar	29-06-15
EPI_ISL_200681	A/ECUADOR/200681/2015	Guayas	14-05-15
EPI_ISL_200680	A/ECUADOR/200680/2015	Guayas	21-05-15
EPI_ISL_197496	A/ECUADOR/197496/2015	Cañar	06-08-15
EPI_ISL_195876	A/ECUADOR/195876/2015	Guayas	25-04-15
EPI_ISL_194961	A/ECUADOR/194961/2015	Azuay	18-02-15

Anexo 2. Secuencias de Influenza B de Ecuador de la región Hemaglutinina

Segment ID	Collection date	Isolate-ID	Isolate name
EPI2361308	2023-Jan-09	EPI_ISL_16830713	B/Ecuador/1135/2023
EPI2361268	2022-Dec-29	EPI_ISL_16830708	B/Ecuador/1036/2022
EPI2361236	2023-Jan-08	EPI_ISL_16830704	B/Ecuador/4157/2023
EPI2361214	2022-Dec-19	EPI_ISL_16830701	B/Ecuador/9746/2022
EPI2361162	2022-Dec-27	EPI_ISL_16830694	B/Ecuador/1301/2022
EPI2361082	2022-Dec-25	EPI_ISL_16830684	B/Ecuador/9758/2022
EPI2361058	2023-Jan-07	EPI_ISL_16830681	B/Ecuador/140/2023
EPI2360981	2022-Dec-25	EPI_ISL_16830671	B/Ecuador/9756/2022
EPI2360973	2023-Jan-09	EPI_ISL_16830670	B/Ecuador/9768/2023
EPI1688378	2019-Sep-16	EPI_ISL_409657	B/Ecuador/1389/2019
EPI1409812	2018-Nov-20	EPI_ISL_350033	B/Ecuador/899/2018
EPI1409749	2018-Dec-15	EPI_ISL_350025	B/Ecuador/1518/2018
EPI1409724	2018-Dec-28	EPI_ISL_350021	B/Ecuador/2067/2018
EPI1409630	2019-Jan-01	EPI_ISL_350009	B/Ecuador/956/2019
EPI1409478	2019-Jan-06	EPI_ISL_349987	B/Ecuador/472/2019
EPI1409393	2018-Nov-15	EPI_ISL_349976	B/Ecuador/4060/2018
EPI1409376	2018-Nov-06	EPI_ISL_349975	B/Ecuador/1239/2018
EPI1409365	2018-Dec-30	EPI_ISL_349973	B/Ecuador/4118/2018
EPI1333528	2018-Jun-18	EPI_ISL_333578	B/Ecuador/4278/2018
EPI1333458	2018-Jun-28	EPI_ISL_333569	B/Ecuador/3997/2018
EPI1272463	2018-Mar-23	EPI_ISL_320936	B/Ecuador/1901/2018
EPI1272455	2018-Jul-06	EPI_ISL_320935	B/Ecuador/2018/2018
EPI1272447	2018-Jun-02	EPI_ISL_320934	B/Ecuador/2875/2018
EPI1272426	2018-Jun-18	EPI_ISL_320931	B/Ecuador/4278/2018
EPI1272418	2018-Jun-29	EPI_ISL_320930	B/Ecuador/0518/2018
EPI1272410	2018-Jun-29	EPI_ISL_320929	B/Ecuador/1218/2018
EPI1272397	2018-Jun-14	EPI_ISL_320927	B/Ecuador/1500/2018
EPI1272389	2018-Jun-28	EPI_ISL_320926	B/Ecuador/3997/2018
EPI1272381	2018-Jun-08	EPI_ISL_320925	B/Ecuador/3979/2018
EPI1272373	2018-Apr-29	EPI_ISL_320924	B/Ecuador/3953/2018
EPI1272360	2018-Jul-04	EPI_ISL_320922	B/Ecuador/1171/2018
EPI1272120	2018-Jul-03	EPI_ISL_320891	B/Ecuador/1418/2018
EPI1182076	2017-Dec-13	EPI_ISL_300091	B/Ecuador/1178/2017
EPI1182068	2017-Dec-27	EPI_ISL_300090	B/Ecuador/3673/2017
EPI1182059	2017-Dec-19	EPI_ISL_300088	B/Ecuador/578/2017
EPI1033925	2017-Jan-23	EPI_ISL_272624	B/Ecuador/54/2017
EPI1033917	2017-Apr-17	EPI_ISL_272623	B/Ecuador/3445/2017
EPI1033910	2017-Apr-02	EPI_ISL_272622	B/Ecuador/3424/2017
EPI1033902	2017-Mar-16	EPI_ISL_272621	B/Ecuador/2934/2017
EPI1033894	2017-Mar-14	EPI_ISL_272620	B/Ecuador/07/2017
EPI830851	2016-May-31	EPI_ISL_233127	B/Ecuador/555/2016
EPI830845	2016-Jun-02	EPI_ISL_233126	B/Ecuador/549/2016
EPI830841	2016-Jul-01	EPI_ISL_233125	B/Ecuador/2439/2016
EPI830833	2016-Jul-21	EPI_ISL_233124	B/Ecuador/2908/2016
EPI830825	2016-Jun-16	EPI_ISL_233123	B/Ecuador/2838/2016
EPI642646	2015-Jun-01	EPI_ISL_195673	B/Ecuador/12015/2015

Anexo 3. Script para la elaboración de gráficos muller plot en R.

```
# Muller plot

library(MullerPlot)
ATRIBUTO = read.csv('ATRIBUTOS_H1.csv', sep = ';')
POBLACION = read.csv('population.datalist_H1.csv', sep = ';')
layout(matrix(c(1,2), nrow = 1), widths = c(0.8, 0.2))
par(mar=c(3, 3, 1, 0))
m.plot <- Muller.plot(attributes = ATRIBUTO, population.data = POBLACION,
                      data.method = "list", time.interval.method =
"linear", mgp=c(2,0.5,0))
plot(0,0, axes = F)
par(mar=c(0, 0, 0, 0))
legend("right", legend = m.plot$name, col = as.character(m.plot$color), pch
= 19)
```

Anexo 4. Secuencias de Influenza aviar H5N1 identificadas en Ecuador. Detalla la identificación del segmento, el segmento del virus, país, identificación de la secuencia, nombre de la secuencia, provincia y laboratorio remitente.

Segment ID	Segment	Country	Collection date	Isolate-ID	Isolate name	Province	Submitting Lab
EPI2245679	HA	Ecuador	2022-Nov-25	EPI ISL 16157545	A/chicken/Ecuador/02/2022	Cotopaxi	Centro Nacional de Influenza (INSPI)
EPI2245701	HA	Ecuador	2022-Nov-25	EPI ISL 16161673	A/chicken/Ecuador/03/2022	Cotopaxi	Centro Nacional de Influenza (INSPI)
EPI2245707	HA	Ecuador	2022-Nov-25	EPI ISL 16161675	A/chicken/Ecuador/04/2022	Cotopaxi	Centro Nacional de Influenza (INSPI)

Anexo 6. Cambios a nivel de sitios de glicosilación entre las secuencias analizadas de la región HA del subtipo A/H1N1 pdm09 con respecto a la cepa vacunal A/Victoria/4897/2022. La primera columna corresponde al nombre de la secuencia, la segunda el número de sitios de glicosilación, el resto de las columnas representa la ubicación del sitio de glicosilación identificado y las letras X representan la presencia de las glicosilaciones correspondiente a la ubicación.

Strain	# glycosylation sites	10	11	23	87	119	162	185	276	287	481	540
A/Victoria/4897/2022-10-02 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/148735/2013-07-19 8gs	8	X	X	X					X	X	X	X
H1/ECUADOR/194930/2015-03-09 8gs	8	X	X	X					X	X	X	X
H1/ECUADOR/233034/2016-06-02 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233035/2016-04-16 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233036/2016-04-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233037/2016-05-04 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233038/2016-06-01 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233039/2016-04-02 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233040/2016-06-10 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/233510/2016-03-24 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233511/2016-03-08 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233512/2016-03-29 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/233513/2016-06-06 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/236829/2016-04-26 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/273796/2017-01-14 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/273797 2017-02-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/299992 2018-01-19 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/299993 2017-12-12 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/299994 2018-01-10 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/299995 2018-01-03 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/299996 2017-12-22 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/299997 2017-12-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300075 2018-01-10 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300076 2018-01-10 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300077 2018-01-02 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300078 2017-12-23 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300079 2018-01-05 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300080 2018-01-11 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300081 2018-01-02 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300082 2017-12-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300083 2017-11-06 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300084 2018-01-05 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300085/2018-01-05 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300086/2017-12-24 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/300087/2018-01-12 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/302838/2017-12-28 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/302974 2018-01-10 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/302977/2018-01-06 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/302980/2018-01-03 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/314049/2017-12-12 8gs	8	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320241/2018-04-01 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/320242/2018-06-02 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320243/2018-03-01 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320244/2018-02-02 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320245/2018-02-07 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320246/2018-02-17 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320247/2018-02-19 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320248/2018-03-13 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320249/2018-03-12 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320250/2018-03-06 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320251/2018-03-19 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320252/2018-07-03 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/320253/2018-03-12 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/320254/2018-03-19 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/340400/2018-03-12 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/345974/2019-01-08 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/346035/2018-12-09 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/349799/2018-12-20 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/349801/2018-12-18 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/349808 2018-12-13 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/349809/2018-12-14 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/349810/2019-01-13 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/391214/2019-01-08 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/402567/2019-11-21 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/402568/2019-11-20 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/402569/2019-11-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/402570/2019-11-21 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/402571/2019-11-28 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/402572/2019-11-28 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404480/2019-11-30 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404481/2019-11-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404482/2019-11-18 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404483/2019-11-04 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404484/2019-11-14 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404489/2019-10-30 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404837/2019-11-12 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404838/2019-09-04 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404839/2019-09-08 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/404840/2019-09-07 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/404841/2019-09-07 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/409522/2019-11-26 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637232/2020-02-06 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637233/2020-01-09 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637234/2020-01-16 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/637235/2020-01-15 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637237/2020-02-05 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637238/2019-12-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637239/2019-12-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637240/2019-12-27 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637241/2020-01-22 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H2/ECUADOR/637242/2020-01-21 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637243/2020-01-08 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637244/2020-01-06 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X
H1/ECUADOR/637245/2020-01-09 9gs	9	X	X	X	X		X		X	X	X	X

Anexo 7. Cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias analizadas de la región HA del subtipo A/H3 con respecto a la cepa vacunal A/Darwin/9/2021. La primera columna corresponde al nombre de la secuencia, la segunda el número de diferencias de aminoácidos con respecto a la cepa de referencia, la tercera columna describe la posición de los cambios en el genoma.

Isolate	Number of Differences	Positions Different
A/Darwin/9/2021 NH.2023-2024/SH.2023		
H3 HA ECUADOR/BARRA/628769/2019-12-27	19	31, 83, 94, 128, 131, 135, 140, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 505, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/402491/2019-11-23	14	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 347, 522
H3 HA ECUADOR/AZUAY/357804/2019-03-15	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/355743/2018-12-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355742/2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355741/2018-11-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355740/2018-12-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355739/2018-12-26	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/355738/2018-12-07	17	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 223, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355737/2019-01-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/355736/2019-01-03	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355735/2018-12-27	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355708/2019-01-11	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/355708/2019-01-11	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/349956/2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/349896/2019-01-14	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/349751/2019-01-12	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/347939/2019-01-03	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/347936/2019-01-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/347935/2019-01-13	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/AZUAY/347931/2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/347929/2018-12-16	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/347927/2019-01-16	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/320332/2018-03-16	18	58, 62, 83, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/320331/2018-05-26	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/320330/2018-04-21	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/320329/2018-03-20	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/299890/2017-12-17	21	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 408, 516, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/277506/2017-02-26	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/277505/2017-03-28	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/275726/2017-03-07	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/275725/2017-04-07	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/275724/2017-04-13	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 259, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/272891/2017-03-05	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 311, 323, 509, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/272890/2017-03-05	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/272889/2017-03-04	17	53, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/272889/2017-01-27	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/272891/2017-01-28	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/272891/2017-02-25	26	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/NAPO/272890/2017-03-14	16	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/ORELLANA/272889/2017-03-25	26	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAJAS/272888/2017-03-21	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/272888/2017-05-18	16	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/272888/2017-03-22	17	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 329, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/232988/2016-03-10	23	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAJAS/232986/2016-04-21	23	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/232521/2016-05-22	24	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/232522/2016-05-21	24	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAJAS/201207/2015-06-01	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/200684/2015-05-08	31	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/200681/2015-02-05	33	3, 5, 62, 83, 92, 94, 112, 121, 122, 128, 131, 144, 156, 157, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 347, 406, 484, 489, 522, 529, 531, 534
H3 HA ECUADOR/CAJAS/200681/2015-06-29	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/200681/2015-05-14	24	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/200680/2015-05-21	26	62, 83, 92, 94, 121, 124, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/CAJAS/197496/2015-08-06	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/195876/2015-04-25	27	3, 62, 83, 92, 94, 121, 124, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 326, 347, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAJAS/194962/2015-06-06	24	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/AZUAY/194961/2015-02-18	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/194960/2015-06-05	26	3, 62, 83, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 300, 326, 406, 484, 522, 529
A/Ecuador/GUAYAS/9103/2022-02-01-04/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9316/2021-12-22/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/3062/2021-12-29/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9112/2022-02-01-31/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9092/2021-12-31-31/HA	6	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9109/2021-12-31-31/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/AZUAY/4287/2021-11-26/HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9107/2022-02-01-06/HA	6	53, 186, 225, 379, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9089/2021-12-31/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/1130/2022-02-01-07/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/3922/2021-12-31-26/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9064/2021-12-31-15/HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9077/2021-12-31-27/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9126/2022-02-01-26/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/3064/2021-12-30/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9078/2021-12-31-27/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9082/2021-12-31-28/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9083/2021-12-31-28/HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/6405/PICHINCHA/2022-11-22	7	50, 78, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/1613/PICHINCHA/2022-11-22	6	50, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/4924/AZUAY/2022-12-20	9	33, 50, 79, 140, 156, 186, 225, 262
A/Ecuador/892/PICHINCHA/2022-12-27	7	50, 79, 140, 156, 186, 225, 450
A/Ecuador/3205/PICHINCHA/2022-11-30	7	50, 79, 140, 156, 186, 225, 413
A/Ecuador/1611/PICHINCHA/2022-11-13	7	50, 79, 140, 156, 186, 214, 225
A/Ecuador/4578/AZUAY/2022-11-07	7	53, 96, 186, 192, 225, 378, 489
A/Ecuador/6432/PICHINCHA/2022-11-29	7	50, 78, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/6063/PICHINCHA/2022-11-28	9	53, 96, 135, 145, 186, 192, 225, 378, 489
A/Ecuador/4813/AZUAY/2022-11-28	6	50, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/2440/PICHINCHA/2022-11-22	6	50, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/4961/AZUAY/2022-12-25	8	33, 50, 79, 140, 156, 186, 225, 262
A/Ecuador/4801/AZUAY/2022-11-25	9	50, 78, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/2386/PICHINCHA/2022-11-23	7	33, 50, 79, 140, 156, 186, 225, 262, 271
A/Ecuador/6430/PICHINCHA/2022-11-28	9	33, 50, 79, 140, 156, 166, 186, 225, 262
A/Ecuador/6058/PICHINCHA/2022-11-25	6	50, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/5051/AZUAY/2023-01-12	8	33, 50, 79, 140, 156, 186, 225, 262
A/Ecuador/6054/PICHINCHA/2022-11-24	7	50, 78, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/2383/PICHINCHA/2022-11-20	6	50, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/4815/AZUAY/2022-11-28	7	50, 79, 140, 156, 186, 225, 472
A/Ecuador/6050/PICHINCHA/2022-11-23	7	50, 78, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/4926/AZUAY/2022-12-20	6	50, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/4824/AZUAY/2022-12-01	7	50, 79, 140, 156, 186, 225, 383
A/Ecuador/6071/PICHINCHA/2022-11-30	6	50, 79, 140, 156, 186, 225
A/Ecuador/4806/AZUAY/2022-11-27	6	

Anexo 8. Diferencia entre sitios de glicosilación de la cepa vacunal 2023 y clados región HA del subtipo A/H3 Ecuador. La primera columna corresponde al nombre de la secuencia, la segunda al número de sitios de glicosilación, el resto de columnas representa la ubicación del sitio de glicosilación identificado y las letras X representan la presencia de las glicosilaciones correspondientes.

Strain	# glycosylation sites	8	22	38	45	63	94	122	126	133	144	158	165	246	285	483
A/Darwin/9/2021 NH.2023-2024/SH.2023 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/IBARRA/ 628769 2019-12-27 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 402491 2019-11-23 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 357824 2019-01-15 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/ 355743 2019-12-04 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355742 2019-01-10 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355741 2018-11-20 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355740 2018-12-20 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355739 2018-12-26 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355738 2018-12-07 10gs	10	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355737 2019-01-04 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355736 2019-01-03 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355735 2018-12-27 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 353709 2019-01-11 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 353708 2019-01-20 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 349561 2019-01-10 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 349898 2019-01-14 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 349761 2019-01-12 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347939 2019-01-03 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347936 2019-01-04 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347935 2019-01-13 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 347933 2019-01-10 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347929 2018-12-16 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347927 2019-01-16 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 320332 2018-03-16 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320331 2018-05-26 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320330 2018-04-21 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320329 2018-03-20 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299991 2018-01-09 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299890 2017-12-17 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 275061 2017-02-26 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 275051 2017-03-28 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 275276 2017-03-07 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275725 2017-04-07 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275724 2017-04-13 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 273640 2017-04-23 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272897 2017-03-05 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272896 2017-03-04 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272893 2017-01-27 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272892 2017-03-28 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272891 2017-02-25 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/NAPO/ 272890 2017-03-14 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/ORELLANA/ 272889 2017-03-25 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAIUMBAR/ 272888 2017-03-21 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272886 2017-05-18 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272885 2017-03-22 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232989 2016-03-16 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232988 2016-03-11 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAIUMBAR/ 232986 2016-04-21 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232553 2016-05-22 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232542 2016-05-21 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAIUMBAR/ 201207 2015-06-01 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAIUMBAR/ 200684 2015-05-08 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200683 2015-02-05 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAIUMBAR/ 200682 2015-06-29 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200681 2015-05-14 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200680 2015-05-21 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAIUMBAR/ 197496 2015-08-06 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 195876 2015-04-25 11gs	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAIUMBAR/ 194962 2015-06-06 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 194961 2015-02-18 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 194960 2015-06-05 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9103/2022 2022-01-04 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9126/2021 2021-12-22 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1062/2021 2021-12-29 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9112/2022 2022-01-14 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9092/2021 2021-12-31 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/819/2021 2021-12-20 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/AZUAY/4287/2021 2021-11-26 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9107/2021 2021-01-06 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9089/2021 2021-12-31 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1130/2022 2022-01-07 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/3922/2021 2021-12-26 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9064/2021 2021-12-15 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/827/2021 2021-12-31 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9077/2021 2021-12-27 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9126/2022 2022-01-26 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1064/2021 2021-12-30 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9078/2021 2021-12-27 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9082/2021 2021-12-28 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9093/2021 2021-12-28 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/6405/PICHINCHA/2022-11-22 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/1613/PICHINCHA/2022-11-22 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/4924/AZUAY/2022-12-20 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/892/PICHINCHA/2022-12-27 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/3285/PICHINCHA/2022-11-30 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/1611/PICHINCHA/2022-11-13 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/4578/AZUAY/2022-11-07 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/6432/PICHINCHA/2022-11-29 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/6063/PICHINCHA/2022-11-28 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/4813/AZUAY/2022-11-28 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/2440/PICHINCHA/2022-11-22 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/4961/AZUAY/2022-12-25 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/4801/AZUAY/2022-11-25 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/2386/PICHINCHA/2022-11-23 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/6430/PICHINCHA/2022-11-28 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/6058/PICHINCHA/2022-11-25 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/5051/AZUAY/2023-01-12 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/6054/PICHINCHA/2022-11-24 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/2383/PICHINCHA/2022-11-20 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/Ecuador/4815/AZUAY/2022-11-28																

En el Anexo 8, se ilustra los patrones de glicosilación de la región de la hemaglutinina del subtipo H3; en la primera columna se detalla el nombre de las secuencias analizadas, en la segunda columna se indica el número de sitios de glicosilación presentes en cada una de las muestras, el resto de columnas detallan la ubicación de los sitios de glicosilación.

Anexo 9. Cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias de Influenza B/Victoria analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Austria/1359417/2021. La primera columna corresponde al nombre de la secuencia, la segunda al número de diferencias de aminoácidos con respecto a la cepa de referencia, la tercera columna describe la posición de los cambios en el genoma.

Isolate	Number of Differences	Positions Different
B/Austria/1359417/2021		
B/Ecuador/2838/2016_PICHINCHA Victoria 2016-06-16	11	127, 136, 144, 150, 162, 163, 164, 184, 197, 203, 279
B/Ecuador/2908/2016_PICHINCHA Victoria 2016-07-21	11	127, 136, 144, 150, 162, 163, 164, 184, 197, 203, 279
B/Ecuador/555/2016_PICHINCHA Victoria 2016-05-31	12	117, 127, 136, 144, 150, 162, 163, 164, 184, 197, 203, 279
B/Ecuador/2934/2017_GUAYAS Victoria 2017-03-16	13	117, 127, 136, 144, 150, 154, 162, 163, 164, 184, 197, 203, 279
B/Ecuador/9768/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-09	2	66, 197
B/Ecuador/9756/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-25	2	66, 197
B/Ecuador/140/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-07	3	129, 197, 252
B/Ecuador/9758/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-25	2	66, 197
B/Ecuador/1301/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-27	2	66, 197
B/Ecuador/9746/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-19	2	66, 197
B/Ecuador/4157/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-08	2	66, 197
B/Ecuador/1036/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-29	2	66, 197
B/Ecuador/1135/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-09	1	197

Anexo 10. Diferencia entre los sitios de glicosilación entre las secuencias de Influenza B/Victoria analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Austria/1359417/2021. La primera columna corresponde al nombre de la secuencia, la segunda al número de sitios de glicosilación, el resto de columnas representa la ubicación del sitio de glicosilación identificado y las letras X representan la presencia de las glicosilaciones correspondientes.

Strain	# glycosylation sites	25	59	145	166	168	197	233	304	333	492	518	531	563
B/Austria/1359417/2021_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/2838/2016_PICHINCHA Victoria 2016-06-16_12gs	12	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/2908/2016_PICHINCHA Victoria 2016-07-21_12gs	12	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/555/2016_PICHINCHA Victoria 2016-05-31_12gs	12	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/2934/2017_GUAYAS Victoria 2017-03-16_12gs	12	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/9768/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-09_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/9756/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-25_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/140/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-07_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/9758/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-25_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1301/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-27_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/9746/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-19_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/4157/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-08_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1036/2022_GUAYAS_Victoria 2022-12-29_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1135/2023_GUAYAS_Victoria 2023-01-09_11gs	11	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X

En el Anexo 10, ilustra la similitud de los sitios de glicosilación entre las secuencias de Influenza B/Victoria y la cepa vacunal B/Austria/1359417/2021.

Anexo 11. Cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias de Influenza B/Yamagata analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Phuket/3073/2013, Anexo complementario al análisis filogenético ilustrado en Figura 25. La primera columna corresponde al nombre de la secuencia, la segunda al número de diferencias de aminoácidos con respecto a la cepa de referencia, la tercera columna describe la posición de los cambios en el genoma.

Isolate	Number of Differences	Positions Different
B/Phuket/3073/2013		
B/Ecuador/12015/2015/MANABI/Yamagata 2015-06-01	1	173
B/Ecuador/2439/2016_AZUAY Yamagata 2016-07-01	4	173, 177, 212, 252
B/Ecuador/549/2016_PICHINCHA_ Yamagata 2016-06-02	2	173, 252
B/Ecuador/07/2017_LOJA Yamagata 2017-03-14	5	78, 173, 177, 212, 252
B/Ecuador/3424/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-04-02	3	146, 173, 252
B/Ecuador/3445/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-04-17	2	173, 252
B/Ecuador/54/2017_TUNGURAHUA Yamagata 2017-01-23	3	146, 173, 252
B/Ecuador/578/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-12-19	2	173, 252
B/Ecuador/3673/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-12-27	2	173, 252
B/Ecuador/1178/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-12-13	2	173, 252
B/Ecuador/1418/2018_CARCHI Yamagata 2018-07-03	2	173, 252
B/Ecuador/1171/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-07-04	2	173, 252
B/Ecuador/3953/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-04-29	3	173, 233, 252
B/Ecuador/3979/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-08	3	173, 233, 252
B/Ecuador/1500/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-14	2	173, 252
B/Ecuador/1218/2018_NAPO Yamagata 2018-06-29	3	173, 212, 252
B/Ecuador/0518/2018_IMBABURA Yamagata 2018-06-29	4	148, 173, 233, 252
B/Ecuador/4278/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-18	2	173, 252
B/Ecuador/2875/2018_AZUAY Yamagata 2018-06-02	3	173, 212, 252
B/Ecuador/2018/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-07-06	2	173, 252
B/Ecuador/1901/2018_CHIMBORAZO Yamagata 2018-03-23	3	173, 252, 256
B/Ecuador/3997/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-28	4	173, 199, 212, 252
B/Ecuador/4118/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-12-30	3	173, 233, 252
B/Ecuador/1239/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-11-06	3	173, 212, 252
B/Ecuador/4060/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-11-15	3	173, 212, 252
B/Ecuador/472/2019_PICHINCHA Yamagata 2019-01-06	3	173, 233, 252
B/Ecuador/956/2019_PICHINCHA Yamagata 2019-01-01	3	173, 212, 252
B/Ecuador/2067/2018_CHIMBORAZO Yamagata 2018-12-28	3	173, 233, 252
B/Ecuador/1518/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-12-15	3	173, 233, 252
B/Ecuador/899/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-11-20	3	173, 212, 252
B/Ecuador/1389/2019_PICHINCHA Yamagata 2019-09-16	4	150, 173, 230, 252

El Anexo 11, representa los cambios a nivel de aminoácidos entre las secuencias de Influenza B/Yamagata analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Phuket/3073/2013.

Anexo 12. Cambios a nivel de sitios de glicosilación entre las secuencias de Influenza B/Yamagata analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Phuket/3073/2013. La primera columna corresponde al nombre de la secuencia, la segunda el número de sitios de glicosilación, el resto de las columnas representa la ubicación del sitio de glicosilación identificado y las letras X representan la presencia de las glicosilaciones correspondientes.

Strain	# glycosylation sites	25	59	145	166	168	197	233	304	333	492	518	531	563
B/Phuket/3073/2013_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/12015/2015/MANABI/Yamagata 2015-06-01_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/2439/2016_AZUAY Yamagata 2016-07-01_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/549/2016_PICHINCHA Yamagata 2016-06-02_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/555/2016_PICHINCHA Victoria 2016-05-31_12gs	12	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/07/2017_LOJA Yamagata 2017-03-14_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/3424/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-04-02_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/3445/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-04-17_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/54/2017_TUNGURAHUA Yamagata 2017-01-23_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/578/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-12-19_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/3673/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-12-27_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1178/2017_PICHINCHA Yamagata 2017-12-13_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1418/2018_CARCHI Yamagata 2018-07-03_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1171/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-07-04_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/3953/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-04-29_12gs	12	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/3979/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-08_12gs	12	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1500/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-14_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1218/2018_NAPO Yamagata 2018-06-29_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/0518/2018_IMBABURA Yamagata 2018-06-29_12gs	12	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/4278/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-18_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/2875/2018_AZUAY Yamagata 2018-06-02_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/2018/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-07-06_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1901/2018_CHIMBORAZO Yamagata 2018-03-23_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/3997/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-06-28_10gs	10	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/4118/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-12-30_12gs	12	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1239/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-11-06_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/4060/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-11-15_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/472/2019_PICHINCHA Yamagata 2019-01-06_12gs	12	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/956/2019_PICHINCHA Yamagata 2019-01-01_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/2067/2018_CHIMBORAZO Yamagata 2018-12-28_12gs	12	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1518/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-12-15_12gs	12	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/899/2018_PICHINCHA Yamagata 2018-11-20_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
B/Ecuador/1389/2019_PICHINCHA Yamagata 2019-09-16_11gs	11	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X

En el Anexo 12, se puede observar los cambios a nivel de sitios de glicosilación entre las secuencias de Influenza B/Yamagata analizadas con respecto a la cepa vacunal B/Phuket/3073/2013, se puede destacar que existen pocos cambios de sitios de glicosilación entre las secuencias estudiadas, sin embargo, en varias de las secuencias de los años 2018 y 2019 presentan adicionalmente el sitio de glicosilación 233, el mismo que no se encuentra en la cepa vacunal, no obstante, no se ha identificado el virus de Influenza B/Yamagata desde el año 2019.

Anexo 13. Análisis de mutaciones de aminoácidos A/H5N1. Ecuador.

Reference	Query	% AA identity	% length coverage	total # mutations	Mutation	Prev. reported effect	Multiple position effect	Structural interaction(s)	Effect on glycosylation	Comments
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	K3N	-	-	viral oligomerization interfaces	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	D61N	-	-	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	R69K	antigenic drift / escape mutant	-	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s)	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	N88R	-	-	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	K98R	-	-	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	T102A	-	-	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	F111L	-	-	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), a T-cell epitope presented by MHC molecules	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	L120M	-	-	viral oligomerization interfaces	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	S139P	-	other and host specificity shift	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	D140N	antigenic drift / escape mutant	antigenic drift / escape mutant	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	A143T	antigenic drift / escape mutant	-	host cell receptor binding, binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	S145L	antigenic drift / escape mutant	host specificity shift	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	S149A	host specificity shift	host specificity shift	host cell receptor binding, viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), antibody recognition sites	-	Mutation HA S149A already occurred 1715 times (37.02% of all samples with HA sequence) in 30 countries. The first strain with this mutation, collected in August 2005, was A/Chicken/Vietnam/Binh Duong477/2005. The mutation most recently occurred in strain A/duck/Bangladesh/35986/2018, collected in December 2018. The study identified mutations that increased α2,6-SA recognition, particularly the S137A_T192I variant that alters both the 130 loop and 190 helix
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	L154Q	antigenic drift / escape mutant	antigenic drift / escape mutant	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	S156A	antigenic drift / escape mutant	-	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	S171D	host specificity shift	-	antibody recognition sites, binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	T172A	host specificity shift and antigenic drift / escape mutant, host specificity shift	antigenic drift / escape mutant and host specificity shift	binding small ligand(s), antibody recognition sites, viral oligomerization interfaces	removes a potential N-glycosylation site at position 170	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	K178I	antigenic drift / escape mutant	-	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	

HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	Q185R	-	-	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s)	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	V190I	-	-	-	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	P197S	-	-	binding small ligand(s), antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	D199N	host specificity shift	antigenic drift / escape mutant	binding small ligand(s), antibody recognition sites, viral oligomerization interfaces	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	A201E	-	-	antibody recognition sites, viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s)	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	R205N	antigenic drift / escape mutant and virulence, antigenic drift / escape mutant and other	antigenic drift / escape mutant	host cell receptor binding, binding small ligand(s), antibody recognition sites, viral oligomerization interfaces, a T-cell epitope presented by MHC molecules, binding host protein(s)	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	Q208K	host specificity shift	host specificity shift	antibody recognition sites, viral oligomerization interfaces, a T-cell epitope presented by MHC molecules	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	I216V	-	-	viral oligomerization interfaces	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	V226A	host specificity shift	-	viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	K234Q	virulence	-	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), host cell receptor binding, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	S239R	host specificity shift	host specificity shift	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s), antibody recognition sites, host cell receptor binding	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	E243D	-	-	viral oligomerization interfaces, binding small ligand(s)	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	N252D	-	-	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	N256H	-	-	binding small ligand(s), viral oligomerization interfaces, antibody recognition sites	-	
HA_H5N1_Human_2005_Indonesia5	HA_A/chicken/Ecuador/02/2022_16157545	92.240	99.649	568	A279T	-	-	viral oligomerization interfaces	-	

El Anexo 13, presenta un análisis de las mutaciones de aminoácidos en las secuencias de Influenza A/H5N1, clado 2.3.4.4b, identificadas en Ecuador en noviembre de 2022. La Tabla proporciona detalles sobre la secuencia de la referencia utilizada para la comparación, el nombre de la secuencia viral de A/H5N1 identificada en Ecuador, el porcentaje de similitud de los aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia y el porcentaje de cobertura. Además, se incluye el número total de mutaciones, los efectos previamente reportados, los efectos acumulativos de cambios de posición, la interacción estructural y el efecto sobre la glicosilación. También se proporcionan comentarios adicionales para una mayor claridad.

Anexo 14. Spatial, temporal and evolutionary insight into seasonal epidemic Influenza A virus strains near the equatorial line: The case of Ecuador.

Virus Research 326 (2023) 199051



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres



Spatial, temporal and evolutionary insight into seasonal epidemic Influenza A virus strains near the equatorial line: The case of Ecuador



Alfredo Bruno ^{a,d}, Natalia Goñi ^b, Juan Cristina ^{c,*}

ARTICLE INFO

Keywords:
Influenza A virus
Evolution
Bayesian
Time series
Ecuador

ABSTRACT

To study the spatial and temporal patterns of Influenza A virus (IAV) is essential for an efficient control of the disease caused by IAV and efficient vaccination programs. However, spatiotemporal patterns of spread as well as genetic lineage circulation of IAV on a countrywide scale have not been clearly determined for many tropical regions of the world. In order to gain insight into these matters, the spatial and temporal patterns of IAV in six different geographic regions of Ecuador, from 2011 to 2021, were determined and the timing and magnitude of IAV outbreaks in these localities investigated. The results of these studies revealed that although Ecuador is a South American country situated in the Equator line, its IAV epidemiology resembles that of temperate Northern Hemisphere countries. Phylogenetic analysis of H1N1pdm09 and H3N2 IAV strains isolated in five different localities of Ecuador revealed that provinces in the south of this country have the largest effective population size by comparison with provinces in the north, suggesting that the southern provinces may be acting as a source of IAV. Co-circulation of different H1N1pdm09 and H3N2 genetic lineages was observed in different geographic regions of Ecuador.

1. Introduction

Influenza A virus (IAV) is a member of the family *Orthomyxoviridae* and contains eight segments of a single-stranded RNA genome with negative polarity (Neumann et al., 2004). Unlike most pathogens where exposure leads to lasting immunity in the host, IAV has the capacity to evade specific immunity triggered by previous infections. This process is called antigenic drift and is the result of the selective fixation of mutations in the gene encoding the hemagglutinin (HA) protein, the major target for the host immune response. Another process, called antigenic shift, occurs when the virus acquires an HA of a different IAV subtype via reassortment of one or more gene segments. This process is thought to be related to the more devastating Influenza pandemics (Ferguson et al., 2003).

There have been three pandemics in last century: in 1918 (H1N1 subtype), 1957 (H2N2 subtype), and in 1968 (H3N2 subtype). During each of these pandemics, the new virus drove the previous pandemic subtype out of circulation (Wolf et al., 2006). In 1977, the H1N1 subtype reappeared, and has been co-circulating with H3N2 subtype to present days (Scholtissek et al., 1978). In 2009, the first pandemic of this century, caused by a new H1N1 pdm09 strain started in Mexico and spread to many several other countries around the world (Scalera and Mossad, 2009).

The global surveillance of IAV have provided an opportunity to explore the drivers of global spread of these viruses (Lemey et al., 2014). However, spatiotemporal patterns of spread as well as genetic lineage circulation of IAV on a countrywide scale have not been clearly determined from any tropical regions of the world (Hirve et al., 2016; Azziz et al., 2012; Viboud et al., 2006). A more complete understanding of the evolution of IAV in these regions are much needed in order to a more efficient control of the disease caused by IAV and efficient vaccination programs. In order to gain insight into these matters, we used a ten-year dataset of 4038 typed, subtyped and antigenically characterized seasonal IAV strains circulating in six different geographic regions of Ecuador and investigated the timing and magnitude of IAV outbreaks in these localities. Besides, we isolated, sequenced, and analyzed the complete codes of 120 HA genes of H1N1 pdm09 and H3N2 IAV strains, sampled between 2016 and 2020 isolated in five Ecuadorian locations.

* Corresponding author.
E-mail address: cristina@ein.edu.uy (J. Cristina).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199051>
Received 8 September 2022; Received in revised form 20 January 2023; Accepted 21 January 2023
Available online 24 January 2023
0168-1702/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

We have found that although Ecuador is a tropical South American country; its epidemiology resembles that of temperate Northern Hemisphere countries.

2. Materials and methods

2.1. Samples sources

Samples analyzed in these studies were collected from severe acute respiratory infection Ecuadorian surveillance system, in the laboratory of the National Influenza Centre; the number of processed samples and Influenza virus positivity per epidemiological week was obtained from the data reported in the WHO Flunet platform; all the genetic sequence were obtained from GISAID platform.

The proposal does not constitute research with human subjects. As a laboratory within the World Health Organization (WHO) Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) for the purposes of global surveillance of Influenza under the WHO Global Influenza Program, neither written informed consents nor explicit ethical approval were sought as this study was only observational and carried out as part of a routine virological surveillance (anonymously, without identification of patients), as established in the terms of reference for WHO National Influenza Centers. In accordance with applicable laws and regulations, no clearance of an Ethics Committee is required in Ecuador for the retrospective analysis of anonymized data collected within routine Influenza surveillance schemes.

2.2. Climate data

For each of the six provinces of Ecuador studied, we compiled monthly mean temperature ($^{\circ}\text{C}$), mean relative humidity (%) and mean precipitation (mm) from Climate-Data.org (available at: www.es.climate-data.org).

2.3. Statistical analysis

Correlation among variables were established using Pearson product-moment correlation test (Wessa, 2023).

2.4. Virus antigenic characterization by hemagglutination inhibition assay

The International Reference Center (CDC, Atlanta) performed the hemagglutination inhibition (HI) tests with a panel of post infection ferret antisera for detailed antigenic characterization and also performed a functional neuraminidase inhibition assay (NI) and/or genetic analysis to assess susceptibility of these viruses to the neuraminidase inhibitors oseltamivir, zanamivir, peramivir and laninamivir.

2.5. PCR amplification and sequencing of ha gene from Ecuadorian IAV strains

For molecular detection of Influenza virus, the CDC Protocol for Real-Time RT-PCR (rRT-PCR) for the detection and characterization of Influenza A and Influenza B used for the National Influenza Centers was used using Ambion AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit enzyme (cat# AM1005) (CDC, 2022a).

RNA was extracted using the QIAamp RNA Viral Minikit from Qiagen.

The primers and probes used for the identification of Influenza types and subtypes are those distributed as part of the support provided by the CDC to the National Influenza Centers and distributed through the International Reagent Resource (IRR) portal.

The IRR kit used for Influenza A and B virus typing was the FR-1701 - CDC Influenza Virus Real-Time RT-PCR Influenza A (H3/H1pdm09) Subtyping Panel (VER 3) (RUO) (Catalog No. FluRUO-15).

The kit used for Influenza Virus H1 and H3 subtyping was the

FR-1711 - CDC Influenza Virus Real-Time RT-PCR Influenza A/B Typing Panel (VER 2) (RUO) (Catalog No. FluRUO-14) (CDC, 2022b)

PCR master mix were prepared according to the following: Nuclease-free water: $N \times 5.0 \mu\text{l}$ first forward primer ($0.8 \mu\text{M}$ final concentration); $N \times 0.5 \mu\text{l}$; Indirect primer (first reverse primer) ($0.8 \mu\text{M}$ final concentration); $N \times 0.5 \mu\text{l}$ Probe (probe) ($0.2 \mu\text{M}$ final concentration); $N \times 0.5 \mu\text{l}$; RT Mix $N \times 1 \mu\text{l}$ and 2X PCR Master Mix $N \times 12.5 \mu\text{l}$.

The Roche Light Cycler 480 II thermal cycler was used for the nucleic acid amplification process, using the following amplification conditions:

Reverse Transcription: 50°C for 30 min. Inactivation of Taq inhibitor 95°C for 10 min. PCR amplification (45 cycles) 95°C for 15 s; 55°C for 30 s * PCR amplification (45 cycles) 95°C for 15 s; 55°C for 30 s * Fluorescence (FAM) data were collected during the 55°C incubation step. Sequencing was carried out by the Centers for Disease Control, Atlanta, USA within the commitments of the Global Influenza Surveillance and Response System for the shipment of periodic samples by the National Influenza Center to the WHO collaborating center. Nucleotide sequences of the Ecuadorian Influenza viruses generated in this study have been deposited in the GISAID database (for accession numbers, strain name, date and place of isolation, see Supplementary Material Table 1).

2.6. Epidemiological time series

In order to extract and visualize of temporal parameters from epidemiological time series, we employed EPIPOI (Alonso and McCormick, 2012). This approach to time series analysis permits to study long term trends, seasonality and anomalies (for example, morbidity figures in particularly severe epidemics as compared to those figures expected based on the trend and regular seasonal and inter-annual variance in surrounding years). Moreover, EPIPOI approach also allows all parameters describing the components of time series from different locations to be plotted and analyzed spatially. For instance, it can show if the timing of the annual peak of a disease change along a latitudinal gradient (Alonso and McCormick, 2012).

2.7. Phylogenetic analysis

Complete HA gene sequences from H1N1pdm09 and H3N2 isolated in the Equatorial provinces of Guayas, Pichincha, Chimborazo, Cañar and Azuay, isolated between 2016 and 2020, were used throughout these studies. For accession numbers, origin and date of isolation, see Supplementary Material Table 1). Sequences were aligned using MAFFT version 7 program (Katoh et al., 2019).

To reconstruct the evolutionary history of IAV strains circulating in Ecuador, a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach was employed using MASCOT v2.1.2 (Muller et al., 2018) as implemented in the BEAST package v2.5.2 (Bouckaert et al., 2019). MASCOT approach implements a structured coalescent approximation by integrating over all possible migration histories. In contrast with other approximations that treat the movement of one lineage completely independently of all other lineages, this approach explicitly includes information about the location of other lineages and their probability of coalescing when modeling the movement of a lineage. First, the evolutionary model that best fit the sequence dataset was determined using the W-IQ-TREE program (Trifunopoulos et al., 2016). Bayesian information criterion (BIC), Akaike information criterion (AIC), and the log of the likelihood (LnL) were used to identify the best model. Statistical uncertainty in the data was reflected by the 95% highest probability density (HPD) values. Results were examined using the TRACER v1.7.2 program (available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Convergence was assessed by effective sample sizes (ESS) above 200. Maximum clade credibility trees were generated by means of the use of the Tree Annotator program from the BEAST package. This method provides a phylogenetic tree that evaluates each of the sampled posterior trees, giving a tree that summarizes the results of a Bayesian phylogeny inference. Visualization of the

phylogenetic trees were done using FigTree v1.4.4 (available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

3. Results

3.1. Estimating seasonal parameters

To study the seasonal activity of IAV in Ecuador, time-series analyses were performed using the EPIPOI epidemiological software package (Alonso and McCormick, 2012).

We analyzed the total number of IAV positive cases per month from January 2011 to December 2021, for a total of 4030 cases from six different geographic regions of Ecuador (see Supplementary Material Fig. 1). The periodic annual function (PAF) of the epidemiological time series was obtained after de-trending with a quadratic polynomial and summing up the annual, semi-annual and quarterly harmonics as obtained by Fourier decomposition (see Fig. 1). Interestingly, our time-series analysis reveals a well-defined annual periodicity (seasonality) resembling the seasonality found for northern hemisphere temperate countries, characterized by epidemic peaks in the winter season of that hemisphere. Next, we estimated the timing and amplitude of the annual primary peak from 2011 to 2021 for each Ecuadorian location studied. Timing of the annual primary peak is when the maximum annual intensity of IAV activity is detected, whereas peak amplitude is equivalent to the strength of the epidemic cycle. We analyzed these parameters as a function of latitude of each location. The results of these studies are shown in Fig. 2.

Monthly primary peaks were established in January for all the Ecuadorian regions studied, (see Fig. 2 and Supplementary Material Fig. 1). Monthly secondary peaks were observed during May for localities in the north and center of Ecuador (Pichincha, Imbabura and Chimborazo), while monthly secondary peaks were observed in August and September for provinces in the south, like Guayas and Azuay (see Fig. 2 and Supplementary Material Fig. 1). Then, the amplitude of primary and secondary peaks was calculated (see Table 1). Roughly similar amplitudes were found for primary peaks for all geographic locations studied. In the case of the amplitudes found for secondary peaks, significant differences (> 30%) were found for Guayas provinces by comparison with other provinces studied (see Table 1).

In order to observe if climatic factors may be related to the seasonality observed, mean monthly temperature (C), precipitation (mm) and humidity (%) were established for all geographic locations studied (see Fig. 3). Primary peak of IAV infections occurs during periods of high precipitation and humidity (see Figs. 2 and 3). Interestingly, significant differences in mean monthly temperatures among Guayas and the rest of the locations studied was found. This is related to the fact that Guayas is situated at sea level with a tropical climate, whereas the rest of the provinces are situated at high altitudes (see also Supplementary Material Fig. 1). Moreover, a significant correlation among mean monthly Influenza cases from 2011 to 2021 and mean monthly temperatures was found for Guayas province (Pearson Cor. = 0.6139, $p < 0.05$). No

correlation among mean monthly Influenza cases and mean monthly temperatures was found for the rest of the provinces studied.

3.2. Bayesian coalescent analysis of IAV isolated in Ecuador

In order to reconstruct the evolutionary history of IAV populations circulating in different Ecuadorian localities, a Bayesian MCMC approach was employed (Bouckaert et al., 2019) using complete codes from HA genes from 67 H1N1 pdm09 (isolated from 2016 to 2020), and 56 H3N2 IAV strains (isolated from 2016 to 2019) from five different Ecuadorian locations (for isolates included in these analyses, see Supplementary Material Table 1). The results shown in Table 2 are the outcome of 20 million steps of the MCMC, using the HKY+ γ nucleotide model, a relaxed molecular clock and a structured coalescent method using MASCOT (Muller et al., 2018).

Mean estimates indicated that Guayas province has the largest effective population size compared with any other Ecuadorian localities studied for H1N1 pdm09 strains. In the case of H3N2 IAV sub-type, Guayas and Cañar provinces have the largest effective population size by comparison with other provinces included in these analyses (see Table 2).

In order to establish the genetic relations among IAV circulating in Ecuador maximum clade credibility trees were constructed for H1N1 pdm09 and H3N2 IAV strains (see Fig. 4). The results of these studies revealed that different genetic lineages co-circulate in different geographic locations of Ecuador. For instance, at least two different H1N1 pdm09 genetic lineages were observed to co-circulate in 2016 in different provinces of the country (see Fig. 4A). In the case of H3N2 strains, several lineages were found to co-circulate in several provinces in 2017 (see Fig. 4B).

4. Discussion

WHO annual Influenza vaccine recommendations are designed to ensure vaccine delivery before the winter-time peak of viral circulation in each hemisphere. However, Influenza seasonal patterns are highly diverse in tropical countries and may be out of phase with the WHO recommendations for their respective hemisphere (Alonso et al., 2015). In fact, previous studies revealed that optimal timing for Influenza vaccination may not correspond to the one expected for their hemisphere in tropical regions of South America (De Mello et al., 2009). In order to gain insight into IAV dynamics in a tropical country as Ecuador, we estimated the seasonal parameters and obtained the periodical time function for IAV epidemics in this country (see Fig. 1). The results of these studies revealed that although Ecuador is a tropical South American country, its epidemiology resembles that of temperate Northern Hemisphere countries, with monthly primary peaks in January (see Figs. 1 and 2).

Moreover, these results suggest that Ecuador is 'out-of-phase' from the recommendations of the use of the Southern hemisphere vaccine and more likely is suitable for receiving the vaccine initially recommended

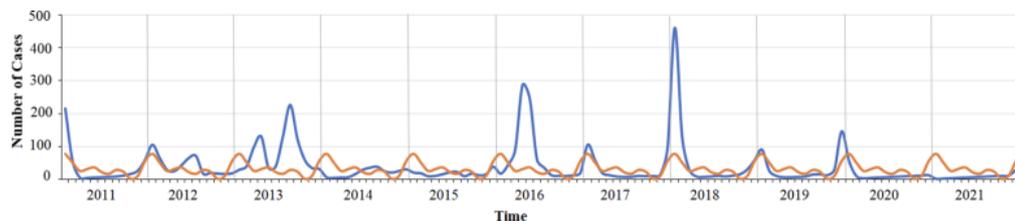


Fig. 1. Seasonality of Influenza A in Ecuador (2011–2021). The periodic annual function obtained by summing the 12-monthly, 6-monthly and 3-monthly harmonics is shown in orange. The original time series is shown in blue.

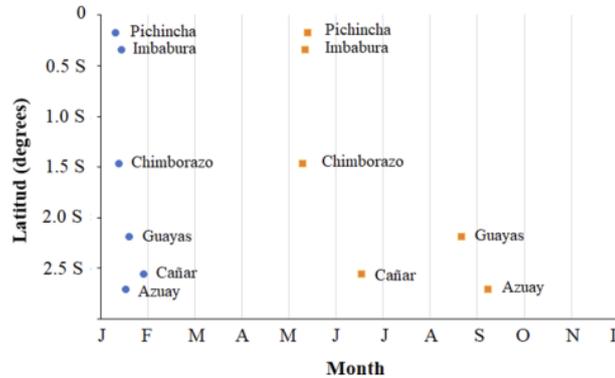


Fig. 2. Timing of the monthly primary and secondary peaks of Influenza A in six different Ecuadorian provinces. The timing of the primary and secondary peak against the latitudinal position of each province is shown. Primary peaks are shown by blue circles, while secondary peaks are shown by orange squares.

Table 1
Time-series parameters found in the seasonality studies of IAV in Ecuador.

Series	Latitude Amplitude	Longitude Amplitude	Month	
			primary peak	secondary peak
	primary peak (%)	secondary peak (%)		
Pichincha	0.1807 S	78.4678 W	1.326	5.416
Imbabura	0.3500 S	78.1167 W	1.453	5.366
95.100	45.658			
Chimborazo	1.4695 S	78.8168 W	1.403	5.303
98.427	45.290			
Guayas	2.1961 S	79.8862 W	1.623	8.676
	106.332	80.530		
Cañar	2.5606 S	78.9394 W	1.926	6.556
	90.483	51.266		
Azuay	2.7138 S	78.8892 W	1.550	9.243
	93.197	12.002		

for the opposite hemisphere.

The WHO Influenza vaccine committee meet twice a year since 1999 to decide on the antigenic composition of Influenza vaccines for the next Influenza season in each hemisphere (Kittler et al., 2002). In the case of the Northern hemisphere, globally circulating Influenza virus strains are reviewed every February, so that the vaccine can be distributed between September and October, in advance of the winter Influenza season of this hemisphere. Likewise, for the Southern hemisphere, Influenza virus circulation patterns are reviewed each September, so that vaccination can take place between March and April of the following year. The current six-month delay between the WHO expert recommendations and vaccine availability is due to limitations of the current technology used in the manufacturing process, which represents a severe challenge for vaccine efficacy (Richard et al., 2010). For these reasons, it is important to investigate national patterns of Influenza virus circulation in tropical countries in order to estimate the most appropriate timing for administering the most appropriate Influenza vaccine. The results of these studies revealed that the Northern hemisphere schedule is more appropriate for Ecuador (see Figs. 1 and 2).

Monthly primary peaks revealed a strong correlation with high precipitation and humidity months in all Ecuadorian locations studied (see Figs. 2 and 3). This is in agreement with previous studies suggesting that epidemics in tropical and sub-tropical regions often occur during

periods of high humidity (Tamerius et al., 2013). This pattern was also observed in other tropical regions of the world, like Thailand (Suntronwong et al., 2020) or Cote d'Ivoire, where rainfall is a good predictor of Influenza activity (Nattia et al., 2016). In the case of Central America, the overall Influenza activity was consistently associated with increased specific humidity in three different tropical countries, but different results were found in the association of temperature and the rainfall, where a positive correlation was found for El Salvador and Panama, but a negative correlation was found for Guatemala (Soebiyanto et al., 2014). This speaks of the need of the characterization of Influenza activity in each particular tropical country.

Guayas province was found to have the larger effective population size for H1N1 pdm09 IAV strains, while Guayas and Cañar were found to have the larger ones in the case of H3N2 IAV population (see Table 2). The results of these studies suggest that provinces in the South of Ecuador may act as a source of Influenza while other provinces may act as a sink (see Table 2 and Supplementary Material Fig. 1). More studies will be needed to address this important issue. Co-circulation of different genetic lineages was observed in both H1N1 pdm09 and H3N2 strains isolated in Ecuador during the same epidemic year (Fig. 4). Moreover, the results of these studies revealed that different genetic lineages co-circulate in different geographic regions of Ecuador at the same time.

5. Conclusions

The results of these studies revealed that although Ecuador is a South American country situated in the Equator line, its IAV epidemiology resembles that of temperate Northern Hemisphere countries, with monthly primary peaks in January. These facts revealed that the Northern hemisphere Influenza vaccination schedule is more appropriate for Ecuador. Monthly primary peaks revealed a strong correlation with high precipitation and humidity months in all Ecuadorian locations studied as observed in other tropical regions of the world. Monthly secondary peaks were observed in May for localities in the north and center of Ecuador, while monthly secondary peaks were observed in August and September for provinces in the south. Differences in secondary peak amplitude were observed for Guayas province. Guayas province was found to have the largest effective population size for H1N1 pdm09 IAV strains, while Guayas and Cañar were found to have the largest ones in the case of H3N2 IAV population. The results of suggest that provinces in the South of Ecuador may be acting as a source of Influenza while other provinces may act as a sink. Co-circulation of different genetic lineages was observed in both H1N1 pdm09 and H3N2

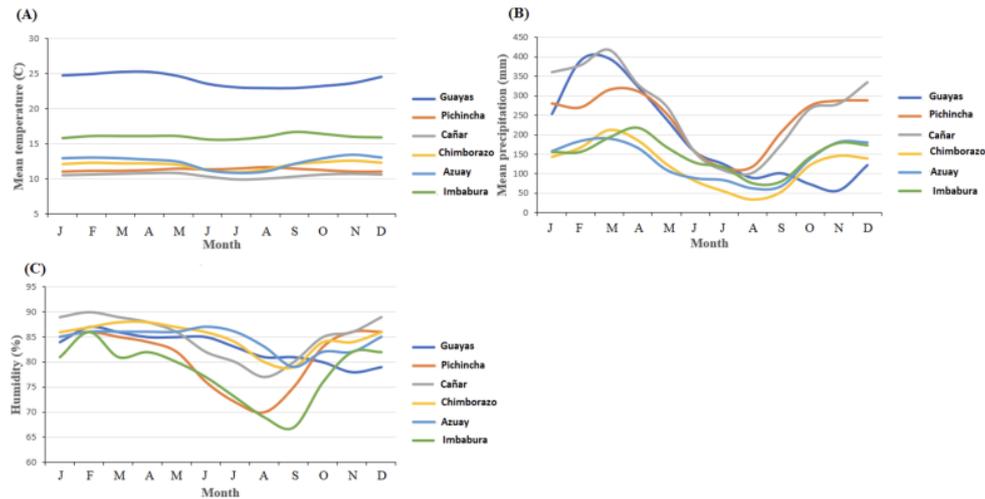


Fig. 3. Climatic parameters of Ecuadorian provinces. Mean monthly temperatures, precipitation and humidity in different Ecuadorian provinces are shown in A, B and C, respectively. Colors assigned to each province is indicated at the right of each graph.

Table 2
Bayesian coalescence inference of IAV isolated in Ecuador.

Group ^a	HPD ^b	ESS ^d	Parameter	Value ^b
H1N1 HA complete sequences -3796.46 to -3730.22		805.90	Posterior	-3767.77
			Prior	-197.32
			-232.00 to -160.60	623.10
			Likelihood	-3570.44
			-3592.56 to -3550.57	831.80
			Ne Azuay ^c	0.523
			0.025 to 1.516	2765.00
			Ne Chimborazo	0.197
			4.12×10^{-3} to 0.745	983.30
			Ne Guayas	1.515
			0.067 to 4.466	2160.00
			Ne Pichincha	0.061
			0.014 to 0.121	1054.50
			Ne Manabí	0.826
6.54×10^{-3} to 3.395	1578.20			
tMRCA ^f	4.17			
4.00 to 4.36	2950.00			
01/16/2016				
H3N2 HA complete sequences -3830.48 to -3761.60		536.30	Posterior	-3006.15
			Prior	-245.34
			-273.09 to -217.38	755.50
			Likelihood	-3560.81
			-3577.91 to -3544.49	3959.60
			Ne Azuay	1.130
			3.91×10^{-3} to 3.973	896.20
			0.010 to 4.675	2155.70
			Ne Cañar	1.430
			Ne Chimborazo	0.630
			0.013 to 2.205	1434.30
			Ne Guayas	1.431
			0.019 to 4.740	2077.90
			Ne Pichincha	0.557
0.020 to 2.304	346.40			
tMRCA ^f	4.817			
4.393 to 5.245				
6442.20				
	01/23/2016			

^a See Supplementary Material Table 1 for strains included in this analysis. ^b In all cases, the mean values are shown. ^cHPD, high probability density values. ^dESS, effective sample size. ^eNe, effective population size. ^ftMRCA, time of the most common recent ancestor is shown in years. The date estimated for the tMRCA is indicated in bold.

IAV isolated in Ecuador. These results revealed that different genetic lineages co-circulate in different geographic regions of Ecuador at the same time.

Funding

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación, PEDECIBA and Comisión Sectorial de Investigación Científica (Grupos I+D grant), Universidad de la República, Uruguay.

Interest

Montevideo, January 20th, 2023.
Dr. Esteban Domingo

Editor
Virus Research

Dear Dr. Domingo:

The reason of this letter is to let you know that Alfredo Bruno, Natalia Goñi and Juan Cristina, we are the authors of the manuscript "Spatial, temporal and evolutionary insight into seasonal epidemic Influenza A virus strains near the equatorial line: the case of Ecuador".

All authors do not have any conflict of interest and we do not have any interest to declare.

All authors have read and approved the final version of this manuscript.

Sincerely,
Dr. Juan Cristina
Corresponding author
Dr. Juan Cristina
Corresponding author

CRediT authorship contribution statement

Alfredo Bruno: Resources, Data curation, Visualization, Investigation. Natalia Goñi: Writing – review & editing. Juan Cristina: Conceptualization, Methodology, Writing – original draft.

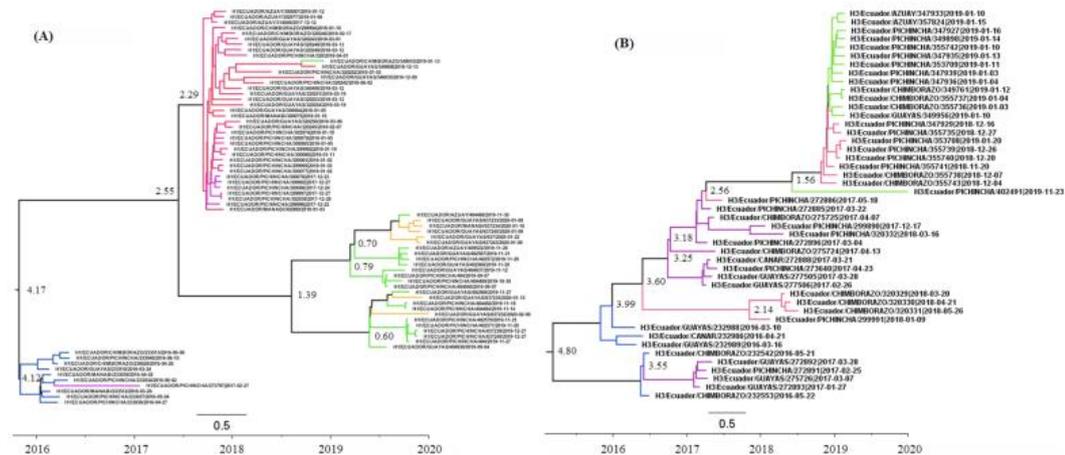


Fig. 4. Bayesian MCMC phylogenetic tree analysis of IAV strains circulating in Ecuador. Maximum clade credibility trees obtained using the HKY+ γ nucleotide model, a relaxed molecular clock and a structured coalescent method using MASCOT are shown. The trees are rooted to the Most Recent Common Ancestor (MRCA). Time to the MRCA is shown in years at the bottom of the figure. Bar at the bottom of the trees denote time in years. Numbers next to the branches show the median height of the branch. Strains in the tree are indicated by type and name followed by date of isolation. Nodes are colored according to the year of isolation. The results found for H1N1 and H3N2 strains are shown in (A) and (B), respectively.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This research was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación and PEDECIBA, Uruguay. We acknowledge Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República, Uruguay, for support through Grupos I+D grant. We acknowledge Multinational Influenza Seasonal Mortality Study (MISMS) from Fogarty International Center, NIH, Bethesda, Maryland, USA and Dr. Wladimir J. Alonso from University of Sao Paulo, Brazil, for encouragement and useful approach to the study of the time series analysis. We would like to thank the Ministry of Public Health of Ecuador, the National Institute of Public Health Research (INSPI), PAHO/WHO, CDC Atlanta, and the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS), for all the support provided.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.virusres.2023.199051.

References

Alonso, W.J., McCormick, B.J., 2012. EPIPOI: a user-friendly analytical tool for the extraction and visualization of temporal parameters from epidemiological time series. *BMC Public Health* 982. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-982>, 12.
 Alonso, W.J., Yu, C., Viboud, C., et al., 2015. A global map of hemispheric Influenza vaccine recommendations based on local patterns of viral circulation. *Sci. Rep.* 5, 17214. <https://doi.org/10.1038/srep17214>.

Azziz, A., Baumgartner, E., Dao, C., Nareen, S., Uddin, M., Mah-E-Munier, S., et al., 2012. Seasonality, timing, and climate drivers of Influenza activity worldwide. *JID* 206. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis467>.
 Bouckaert, R., Vaughan, T.G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., et al., 2019. BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 15, e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>.
 Ferguson, N.M., Galvani, A.P., Bush, R.M., 2003. Ecological and immunological determinants of Influenza evolution. *Nature* 422, 420–433. <https://doi.org/10.1038/nature01509>.
 Hirve, S., Newman, L.P., Paget, J., et al., 2016. Influenza seasonality in temperate and subtropics—when to vaccinate? *PLoS One* 11, e0153003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153003>, 2016.
 Lemey, P., Rambaut, A., Bedford, T., 2014. Unifying viral genetics and human transportation data to predict the global transmission dynamics of human Influenza H3N2. *PLoS Pathog.* 10, e1003932. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003932>.
 Neumann, G., Brownlee, G.G., 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.
 De Mello, W.A., De Paiva, T.M., Ishida, M.A., et al., 2009. The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the Brazilian case examined under alternative scenarios. *PLoS One* 4, e5095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005095>.
 Müller, N.F., Rasmussen, D., Stadler, T., 2018. MASCOT: parameter and state inference under the marginal structured coalescent approximation. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty406> bty406.
 N'gatta, A.K., Coulibaly, D., Nzussou, N.T., Kadjo, H.A., Chérif, D., Traoré, Y., Kouakou, B.K., Kouassi, P.D., Ekra, K.D., Dagnan, N.S., Williams, T., Tiembre, I., 2016. Effects of climatological parameters in modeling and forecasting seasonal influenza transmission in Abidjan, Côte d'Ivoire. *BMC Public Health* 16, 972. doi: 10.1186/s12889-016-3503-1.
 Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 4, 1160. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx103>.
 Kitler, M.E., Gavinio, P., Lavanchy, D., 2002. Influenza and the work of the World Health Organization. *Vaccine* 20, S5–S14. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00121-4).
 Richard, S.A., Viboud, C., Miller, M.A., 2010. Evaluation of southern hemisphere Influenza vaccine recommendations. *Vaccine* 28, 2693–2699. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.053>.
 Scalera, N.M., Mossad, S.B., 2009. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant Influenza A (H1N1) virus. *Postgrad. Med.* 121, 43–47. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.09.2051>.
 Scholtissek, C., Von Hoyningen, V., Rott, R., 1973. Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of Influenza and human Influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1). *Virology* 69, 613–617. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90203-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90203-9).

- Soebiyanto, R.P., Clara, W., Jara, J., et al., 2014. The role of temperature and humidity on seasonal influenza in tropical areas: Guatemala, El Salvador and Panama, 2008–2013. *PLoS One* 9, e100659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100659>.
- Suntronwong, N., Vichaiwattana, P., Klinfueng, S., et al., 2020. Climate factors influence seasonal influenza activity in Bangkok, Thailand. *PLoS One* 15, e0239729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239729>.
- Tamerius, J.D., Shaman, J., Alonso, W.J., Bloom-Feshbach, K., Uejio, C.K., Comrie, A., Viboud, C., 2013. Environmental predictors of seasonal influenza epidemics across temperate and tropical climates. *PLoS Pathog.* 9 (3), e1003194. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003194>.
- Trifunopoulos, J., Nguyen, L.T., Von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44 (W1), W232–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>.
- Viboud, C., Alonso, W.J., Simonsen, L., 2006. Influenza in tropical regions. *PLoS Med.* 3, 468–471. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030009>.
- Wessa, P., 2017. Free statistics software, Office of research development and education, version 1.2.1. <https://www.wessa.net>.
- Wolf, Y.I., Viboud, C., Holmes, E.C., Koonin, E.V., Lipman, D.J., 2006. Long intervals of stasis punctuated by bursts of positive selection in the seasonal evolution of Influenza A virus. *Biol. Direct* 1, 34. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-34>.

Anexo 15. Phylogenetic analysis reveals that the H5N1 avian influenza A outbreak in poultry in Ecuador in November 2022 is associated with the highly pathogenic clade 2.3.4.4b.

International Journal of Infectious Diseases 133 (2023) 27–30



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid



Case Report

Phylogenetic analysis reveals that the H5N1 avian influenza A outbreak in poultry in Ecuador in November 2022 is associated with the highly pathogenic clade 2.3.4.4b



Alfredo Bruno^{1,2,#,*}, Alonzo Alfaro-Núñez^{3,4,#}, Doménica de Mora¹, Rubén Armas^{1,5}, Maritza Olmedo¹, Jimmy Garcés¹, María Sol Vaca⁶, Euclides De la Torre⁶, David Jarrin⁶, Lidia Burbano⁶, Johanna Salas⁶, Cristian Imbacuan⁶, José Chanatasig⁶, Margoth Barrionuevo⁶, María Cristina Galante⁶, Veronica Salas⁶, Natalia Goñi⁷, Juan Cristina⁸, Christian Steffe Domingues⁹, Lucas Oliveira Montesino⁹, Fernanda Gomes Cardoso⁹, Dilmara Reischak⁹, Miguel Angel Garcia-Bereguain^{10,*}

¹ Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación "Leopoldo Izquieta-Pérez", Guayaquil, Ecuador

² Universidad Agraria del Ecuador, Guayaquil, Ecuador

³ Department of Clinical Biochemistry, Naestved Hospital, Naestved, Denmark

⁴ Section for Evolutionary Genomics, GLOBE Institute, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

⁵ Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador

⁶ Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario ("Agrocalidad"), Ministerio de Agricultura y Ganadería, Ecuador.

⁷ Centro Nacional de Referencia de Influenza, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública, Montevideo, Uruguay

⁸ Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁹ Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura e Pecuária, São Paulo, Brasil

¹⁰ One Health Research Group, Universidad de Las Américas, Quito, Ecuador

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2023

Revised 14 April 2023

Accepted 17 April 2023

ABSTRACT

The ongoing H5N1 outbreak in the Americas caused by clade 2.3.4.4 is causing unprecedented impact in poultry and wild birds. In November 2022, a highly pathogenic avian influenza A outbreak was declared in poultry in Ecuador, affecting more than 1.1 million heads of poultry in two farms by February 2023. Phylogenetic analysis shows that the virus clade is 2.3.4.4b, and to the best of our knowledge, this is the first scientific publication reporting this clade in South America.

© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases.

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

Introduction

The highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIVs) represent a main threat to animal health, causing important losses in the poultry industry and affecting wild bird populations. Moreover, those viruses are a permanent threat to public health due to their potential zoonotic transmission to humans. Among avian influenza viruses, HPAIV of the H5 subtype descendant of the H5N1 virus, first detected in China in 1996, belong to the

A/goose/Guangdong/1/1996 lineage. The hemagglutinin gene of the H5 viruses of the A/goose/Guangdong/1/1996 lineage evolved into multiple phylogenetic clades that have caused outbreaks in poultry and wild birds worldwide [1,2]. Repeated transmission events from poultry into migratory wild bird populations in Asia allowed these viruses to spread across Eurasia, Africa, and North America [3].

Since 2020, the outbreaks caused by influenza A H5N1 2.3.4.4b clade have been reported in many countries in Europe, Asia, Africa, and North America [3]. This clade is of high concern due to their reassortment ability, transmission efficacy in birds, and transmission capacity across species infecting new hosts, including humans and other mammals [4–7]. In fact, H5N1 2.3.4.4b clade was recently included in the list of zoonotic influenza candidate vaccine viruses by the World Health Organization [8].

* Corresponding authors.

E-mail addresses: alfredobruno@gmail.com (A. Bruno),

magbereguaian@gmail.com (M.A. Garcia-Bereguain).

These authors have contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.04.403>

1201-9712/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

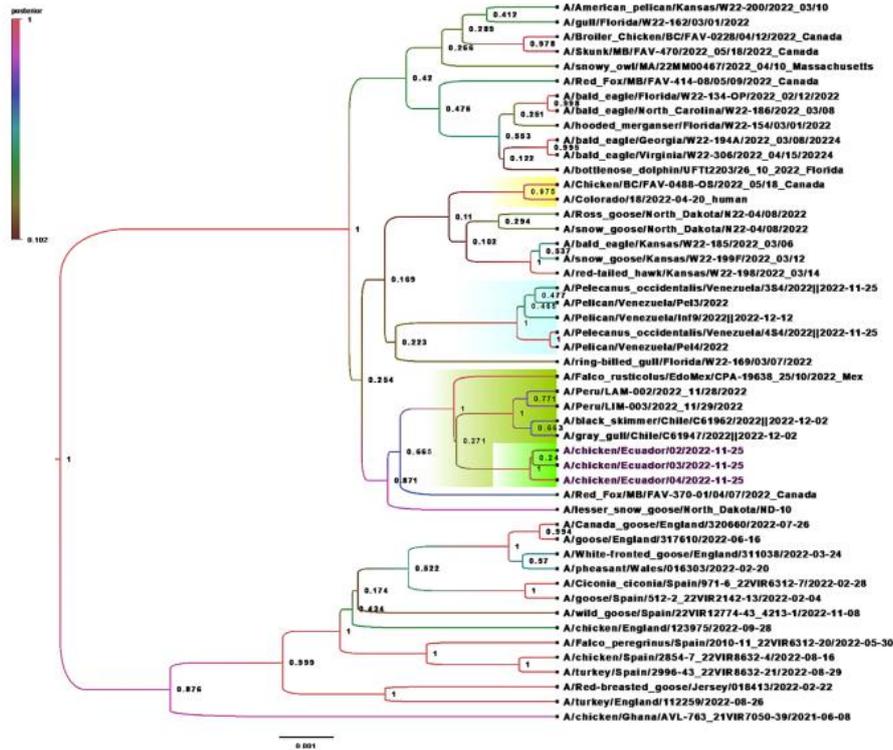


Figure 1. HPAIV H5N1 clade 2.3.4.4b phylogeny in the Americas in 2021–2023 showing the spread over time, across species and countries. The phylogeny is based on the hemagglutinin and includes all the sequences from the Americas in 2021–2023 (excluding identical sequences) resulting from the BLAST search in the GISAID EpiFlu database using the viral sequences identified in Ecuador as reference; also, other representative clade 2.3.4.4b from Africa and Europe were included.

The ongoing H5N1 clade 2.3.4.4b outbreak in the United States is causing unprecedented impact in poultry and wild birds. According to the Center for Diseases Control and Prevention of the United States, more than 53 million heads of poultry infected and more than 4,000 cases in wild birds have already been reported [9,10]. Also, a case of poultry to human infection was reported in Colorado (United States) in April 2022 [6]. After the virus spread in North America, new H5N1 outbreaks in poultry and wild birds were detected in Mexico, and more recently, in Colombia, Peru, and Venezuela in late 2022 and Chile, Argentina, and Uruguay in 2023. In Colombia, the outbreak was reported in poultry and is currently affecting 35 locations in the northern Caribbean coast [10]. In Peru, the outbreak was reported in wild pelicans in the northern Piura department at the border with Ecuador, and it is spreading to the south and currently affecting pelican populations in the Lambayaque and Lima departments [10]. In Venezuela, the outbreak was also reported in wild pelicans at Anzoategui state. In Chile, the outbreak is affecting wild birds, such as pelicans, gray gulls, or black skimmers (viral sequences were uploaded to Global Influenza Surveillance AID (GISAID) database from Peru, Venezuela, and Chile at the time of writing this manuscript).

Case report

With respect to the HPAIV H5N1 outbreaks in neighboring countries, the regulatory agency for animal health in Ecuador (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario-Agrocalidad, Ministerio de Agricultura y Ganadería) reinforced the national avian flu surveillance program. An unusual mortality in a poultry farm in Cotopaxi Province (Andean region of Ecuador) rose concerns, and samples were collected for H5 flu detection by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). By November 24, 2022, an outbreak of avian H5 flu was declared. Up to February 2023, more than 1.1 million animals were affected from two different poultry (chicken) farms in Cotopaxi (November 2022) and Tungurahua provinces (January 2023). Further cases from domestic poultry (chicken) at Bolivar, Tungurahua, and Pichincha provinces were reported in 2023. Also, positive wild birds from El Oro and Santa Elena provinces were reported in January 2023.

Tracheal and cloacal swabs from H5 positive chicken (from the farm where the outbreak started in Cotopaxi Province) were submitted to the National Influenza Centre of Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación and the primary RT-PCR results were confirmed as H5N1, using the Centers for Disease Control and

Prevention influenza virus real-time RT-PCR panel and influenza A/H5 (Asian lineage) subtyping panel. Three of these samples had low cycle threshold values and were selected to perform whole genome sequencing (Supplementary Table 1). Moreover, 15 tracheal and cloacal swabs from positive chickens were spotted onto Flinder Technology Associates (FTA) cards and submitted to the Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, a regional reference laboratory for avian influenza, for confirmatory and complementary assays. After acid nucleic extraction, the samples were submitted to RT-qPCR assays for the detection of influenza A and the H5 subtype. A total of 13 of 15 samples were positive for both influenza A and H5. The two samples with the lowest cycle thresholds were selected to perform a neuraminidase subtype-specific RT-PCR and for Sanger sequencing to determine pathogenicity. For both samples, fragments of predicted size were amplified for N1 subtype and the amino acid sequence of the protease cleavage site of hemagglutinin protein revealed the presence of multiple basic amino acids, PLREKRRKR/GLF, which is characteristic of HPAIVs.

The three H5N1 samples selected for whole genome sequencing generated full-genome sequences, which were deposited into GISAID (EPI_ISL_16157545, EPI_ISL_16161673 and EPI_ISL_16161675). A pairwise alignment of the neuraminidase region was performed with basic local alignment search tool—BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)—with a nucleotide identity homology of 1401/1408 (99%). To determine the origin of the three viral samples, an alignment of the hemagglutinin gene was created by matching the three isolates to the previously determined reference sequences (see Figure 1 for details) using the MAFFT alignment method. The Hasegawa-Kishino-Yano and invariable substitution model was determined as the best fitted model for the alignment with the software jModelTest 2.1.10. Bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling in BEAST version 2.7.1 was executed using a Strick molecular clock, with the Coalescent Bayesian Skyline prior with 10 million generations.

Our analysis revealed that the H5N1 viruses identified in Ecuador belong to the highly pathogenic clade 2.3.4.4b (Figure 1). This strain is closely related to H5N1 clade 2.3.4.4b viruses isolated from a red fox from Canada and a falcon from Mexico, suggesting a possible transmission route from North America to South America and across host species (Figure 1). The strains isolated from Ecuador clustered with the strains isolated from pelicans from Peru and wild birds from Chile (Figure 1) and are closely related to the strains isolated from pelicans in Venezuela, confirming the circulation of HPAIV clade 2.3.4.4b in several countries of South America.

Using the FluSurfer tool (<http://flusurver.bii.a-star.edu.sg>), an analysis of the amino acid mutations presented in the available regions of the sequences isolated in Ecuador was performed. Mutations associated with antigenic drift, escape mutant, host specificity shift, and virulence were identified, which may affect the transmission dynamics and severity of the virus, as well as an increase in the risk of accidental transmission from bird to human [11–13]. The description of the mutations is detailed in Supplementary Table 2.

The detection of the H5N1 clade 2.3.4.4b in pelicans from Venezuela, Peru, and Chile highlights the significant role of migratory wild birds in the spread of highly pathogenic avian influenza strains because it has been described for transmission from Europe to North America [3]. Moreover, this is, to the best of our knowledge, the first report on a scientific journal of this highly pathogenic avian influenza clade 2.3.4.4b in South America, where implications for animal health are of concern. In one hand, in the context of low- and middle-income countries, such as South America, the impact of this outbreak in poultry production is expected to be stronger than at high income countries due to the weakness of the surveillance programs; this could potentially affect even the food supply. Also, the presence of domestic poultry in rural

neglected communities is common in Ecuador, especially in the province where the outbreak was declared. This scenario would potentially facilitate the contact of humans with infected animals, promoting zoonotic transmission of avian influenza in a context of a weak public health system. On the other hand, countries, such as Ecuador, has a great biodiversity, including multiple endemic species in iconic areas, such as the Amazonia and the Galapagos Islands [14]. Those wild bird communities could be affected by the spread of the highly pathogenic 2.3.4.4b clade because the involvement of wild migrant birds in the spillover of avian flu is well known [1,2]. In summary, both public health and environmental health could be compromised by highly pathogenic avian flu outbreaks; so, reinforcing avian flu surveillance programs in the region with a One Health perspective, including sentinel monitoring of wild bird population, is highly recommended [1,2,6].

Conclusion

In conclusion, our phylogenetic analysis confirms that the current avian flu outbreak in Ecuador was originated by an HPAIV H5N1 strain belonging to the clade 2.3.4.4b, with potential zoonotic transmission across species, including mammals.

Declarations of competing interest

The authors have no competing interests to declare.

Funding

The authors would like to thank the Ministry of Public Health of Ecuador, the National Institute of Public Health Research, Pan American Health Organization/World Health Organization, REV-ELAC network, Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, and the Global Influenza Surveillance and Response System for all the support provided.

Ethical approval

This study does not require institutional review board approval as only poultry surveillance information and online accessible genome sequences were used.

Acknowledgments

The author gratefully acknowledge the laboratories worldwide for providing the sequences to the GISAID database.

Author contributions

All the authors contributed to conceptualization, experiments, data analysis and review the final version of the manuscript. AAN and AB performed the phylogenetic analysis, and contributed to manuscript writing. MAGB wrote the first draft of the manuscript and the final version.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ijid.2023.04.403](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.04.403).

References

- [1] Smith GJ, Donis RO. World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5 Evolution Working Group. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014. *Influenza Other Respir Viruses* 2015;9:271–6. [doi:10.1111/irv.12324](https://doi.org/10.1111/irv.12324).

- [2] Dhingra MS, Artois J, Dellicour S, Lemey P, Dauphin G, Von Dobschuetz S, et al. Geographical and historical patterns in the emergences of novel highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5 and H7 viruses in poultry. *Front Vet Sci* 2018;**5**:84. doi:10.3389/fvets.2018.00084.
- [3] Günther A, Krone O, Svansson V, Pohlmann A, King J, Hallgrímsson GT, et al. Iceland as stepping stone for spread of highly pathogenic avian influenza virus between Europe and North America. *Emerg Infect Dis* 2022;**28**:2383–8. doi:10.3201/eid2812.221086.
- [4] Floyd T, Banyard AC, Lean FZK, Byrne AMP, Fullick E, Whittard E, et al. Encephalitis and death in wild mammals at a rehabilitation center after infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2021;**27**:2856–63. doi:10.3201/eid2711.211225.
- [5] Oliver I, Roberts J, Brown CS, Byrne AMP, Mellon D, Hansen R, et al. A case of avian influenza A(H5N1) in England, January 2022. *Euro Surveill* 2022;**27**:2200061. doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.27.5.2200061.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. Influenza (Flu). <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2021-2022/update-human-avian-influenza.htm>; 2022 [accessed 03 February 2023].
- [7] Sanogo IN, Djegui F, Akpo Y, Ghanvi C, Dupré G, Rubrum A, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus in Poultry, Benin, 2021. *Emerg Infect Dis* 2022;**28**:2534–7. doi:10.3201/eid2812.221020.
- [8] World Health Organization. Influenza (Flu): Summary of status of development and availability of A(H5N1) candidate vaccine viruses and potency testing reagents - Northern Hemisphere 2021–2022. https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/avian-influenza/vaccine-viruses/docs/default-source/influenza/cvvs/zoootic-cvv/h5n1/summary_a_h5n1_cvv_nh2021_22_20210305_2021 [accessed 03 February 2023].
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. Influenza (Flu). H5N1 Bird Flu: Current Situation Summary. <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/avian-flu-summary.htm>; 2023 [accessed 03 February 2023].
- [10] Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud *Alerta Epidemiológica: brotes de Influenza Aviar e infección humana causada por influenza A(H5)*. Implicaciones para la salud pública en Región de las Américas. 11 de enero de 2023. Washington, DC: OPS/OMS; 2023.
- [11] Yamada S, Hatta M, Staker BL, Watanabe S, Imai M, Shinya K, et al. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog* 2010;**6**:e1001034. doi:10.1371/journal.ppat.1001034.
- [12] Lee CY, An SH, Kim I, Go DM, Kim DY, Choi JG, et al. Prerequisites for the acquisition of mammalian pathogenicity by influenza A virus with a prototypic avian PB2 gene. *Sci Rep* 2017;**7**:10205. doi:10.1038/s41598-017-09560-z.
- [13] MdG Hossain, Akter S, Dhole P, Saha S, Kazi T, Majbaudhin A, MdS Islam. Analysis of the genetic diversity associated with the drug resistance and pathogenicity of influenza A virus isolated in Bangladesh from 2002 to 2019. *Front Microbiol* 2021;**12**:735305. doi:10.3389/fmicb.2021.735305.
- [14] Zambrano-Mila MS, Freire-Paspuel B, Orlando SA, Garcia-Bereguain MA. SARS-CoV-2 infection in free roaming dogs from the Amazonian jungle. *One Health* 2022;**14**:100387. doi:10.1016/j.onehit.2022.100387.