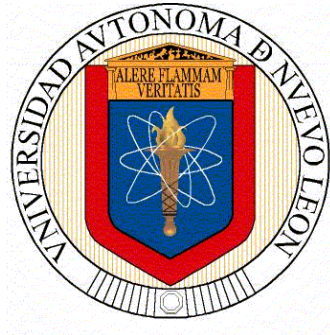


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA
INFLUENZA: ANÁLISIS GENÓMICO Y ASOCIACIÓN CON
LA PRESENTACIÓN CLÍNICA EN SUJETOS INFECTADOS**

Presenta:

BLANCA ESTHELA ALVAREZ SALAS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORADO EN MEDICINA

ENERO 2022

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA INFLUENZA: ANÁLISIS
GENÓMICO Y ASOCIACIÓN CON LA PRESENTACIÓN CLÍNICA EN
SUJETOS INFECTADOS

Por:

M.C.P. BLANCA ESTHELA ALVAREZ SALAS

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Enero 2022

“Epidemiología molecular del virus de la influenza: Análisis genómico y asociación con la presentación clínica en sujetos infectados”

Aprobación de la tesis

Dra. C. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA
Directora de Tesis

Dr. Med. JAVIER RAMOS JIMÉNEZ
Co-Director de Tesis

Dr. C. GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS
Miembro de Comisión Doctoral

Dr. C. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Miembro de Comisión Doctoral

Dra. C. MARÍA DE LOS ÁNGELES CASTRO CORONA
Miembro de Comisión Doctoral

Dr. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra.C. Ana María G. Rivas Estilla y la co-dirección del Dr. Med. Javier Ramos Jiménez.

La selección de pacientes y toma de muestras se realizaron en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, también se incluyeron muestras y datos clínicos recolectados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Nuevo León.

El procesamiento de las muestras, así como los análisis moleculares se realizaron en el Centro de Investigación e Innovación en Virología Médica (CIIViM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Este estudio fue financiado con recursos propios del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio por sus características se considera de riesgo bajo para el paciente. La participación de los pacientes consistió en proporcionar datos personales socio-demográficos y datos clínicos sobre su patología para fines de investigación, así como una muestra de exudado nasofaríngeo, faríngeo o lavado bronquio-alveolar según fuera más conveniente para evitar la manipulación y/o el riesgo hacia el mismo.

El estudio fue autorizado por el Comité de Ética para la Investigación del Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la universidad Autónoma de Nuevo León con el número de registro: BI14-002 y por la Dirección de Enseñanza, Investigación en Salud y Calidad de la Secretaría de Salud del estado de Nuevo León con el número de registro: DEISC-19011742.

DEDICATORIA

A mi abuela.... Ojalá fueras eterna

AGRADECIMENTOS

Primero que nada, a Dios, por siempre tener planes inesperados para mi vida que la enriquecen enormemente, y por rodearme siempre de personas increíbles que no sólo me permiten completar tales planes, si no también me hacen disfrutar el camino.

A mi esposo por ser mi compañero y mi apoyo, por aguantarme en los momentos más tristes, frustrantes y estresantes, pero sobre todo por crear los momentos más felices y hacer que todo esto valga aún más la pena. Raúl, sé que no te lo hago saber lo suficiente, pero eres la tierra que me hace estar de pie y equilibrada, sin esa base no podría nunca construir firme hacia arriba.

A mis hijos, por convertirse en el motor y motivo principal para seguir trabajando, mejorando y soñando; Raúl, Mariana, no tienen idea de la perspectiva que trajeron a mi vida, y de la manera en que modificaron mi percepción de la plenitud, llegaron en el momento perfecto para cambiar mis prioridades, para dejar de medir el tiempo en minutos, días y horas, y hacerlo en momentos, recuerdos, logros, cambios; Pero principalmente llegaron para lograr darme cuenta de que las metas no son sólo el producto final, si no la suma de todo lo que recolectaste en el camino que nadie más que tú recorre.

A mi familia, a mi abuela que siempre tuvo una palabra de aliento desde el momento que le conté del proyecto; A mis papás, que siempre a su manera me han apoyado y me han permitido prepararme hasta llegar a un posgrado, no

tengo como pagarles el esfuerzo que han hecho educándome a lo largo de mi vida, en cada aspecto de ella, y con todo el esfuerzo que eso les ha representado en muchos niveles; A mis hermanos, que son mis confidentes, mis amigos y que siempre saben cómo aconsejarme en cualquier situación que se presente, sin ustedes nada de lo que soy sería lo mismo, mi sola existencia y personalidad tiene una pieza de cada uno de ustedes .

A la Dra. Ana María Rivas por confiar en mí y abrirme no sólo las puertas de su laboratorio, si no de su casa, por ser una excelente tutora y convertirse en un modelo a seguir para mi vida; Porque no es fácil ser mujer, y mucho menos ser una mujer de ciencia, pero usted es madre, hija, compañera, maestra, inspiración, científica, catedrática, jefa y feminista, gracias por inspirar a cada una de las personas que tenemos la fortuna de formar parte de un fragmento de su recorrido, por darnos las herramientas para exigirnos más y nunca encasillarnos en un solo rol.

Al Dr. Javier Ramos Jiménez por su apoyo y orientación para la realización de éste proyecto.

A la Dra. Ángeles Castro Corona, Dr. Gerardo Padilla Rivas y al Dr. Roberto Montes de Oca por su disposición, su tiempo y su valiosa colaboración como miembros de la comisión de tesis.

Al Dr. Pedro Piedra y al Dr. Eduardo Garza por su apoyo, su disposición, sus recomendaciones y toda su aportación a beneficio del proyecto.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez por las oportunidades tan grandes que me dio, por confiar en mí.

A mis compañeros del Laboratorio de Infectología Molecular por toda su paciencia, apoyo, amistad y colaboración; En especial al Dr. Daniel Arellano que desde que llegué como una extraña me ofreció su ayuda y su amistad, por ser otro tutor para mí, el Chandler de mi Joey, la Hallie de mi Annie, por enseñarme y enseñarme hasta que aprendí, por estar al pendiente de mi trabajo y sobre todo por los incontables momentos de risa, diversión, cajas malignas, video llamadas eternas, desahogo y trabajo, te has convertido en parte imprescindible de mi vida, más que un mejor amigo, un miembro más de mi familia, por personas como tú vale la pena seguir queriendo hacer las cosas bien, a estas alturas no puedo imaginar mi vida sin ti en ella; Al Dr. C. Kame Alberto Galán, por toda la paciencia hacia mi persona, en el trabajo de laboratorio, en las horas manejando para llevar muestras, gracias por sacar adelante el proyecto, por ser Pepe grillo, por contestarme correos a deshoras y en días de descanso, no hay manera de regresar toda la ayuda para poder cumplir ésta meta.

Juany, que se partía en 10 cosas diferentes, hacía que los días tuvieran 30 horas y las semanas 12 días, pero al final siempre sabía exactamente qué hacer, con quien dirigirse o como lograr resolver los problemas; Gracias por dejarme aprender de ti e inspirarme con todo lo que has logrado y seguirás logrando, por ser ejemplo de perseverancia y trabajo duro.

A mis amigos, que estuvieron para mí en buenas y malas y comprendieron cada vez que no era justa y no podía estar para ellos, gracias por todo su apoyo, en especial a la Dra. Med. Paulina Delgado González, mi hermana de otros padres, que vio comenzar éste sueño, que estuvo ahí en lágrimas, en alegrías y

siempre fue una fuente inagotable de apoyo, palabras de aliento y tacos, no sabes cuantas veces evitaste que tirara la toalla.

A la próxima Doctora C. Verónica Alvarado Martínez, por convertirse en parte fundamental de mi vida, la tía de mis hijos, por siempre tener ojos y oídos para permitirme desahogarme, contestarme cada llamada, aunque no sea su naturaleza, ser compañera de series, películas navideñas y comedias románticas, por ir al caos que es mi casa por su propia voluntad repetidas veces y ser un ejemplo para mejorar en cada aspecto.

A David, mi amigo, almacén de comentarios sarcásticos, comida vegetariana, libros, arreglos de todo tipo y comprensión, espero sepas el enorme aporte que fue tu persona para todo esto y para cada cosa que hago. Te quiero.

A todos mis compañeros de Bioquímica pregrado, que a pesar de que en algunas ocasiones les cargué la mano con trabajo, siempre estuvieron para ayudarme, nada de esto sería posible sin todas las manos que conforman este equipo, MES Blanca Alemán, MC Lolys, Nancy, Vero Loaiza, Francisco, Oscar, Jorge, Vicky, mis hijos becarios y estudiantes.

Sé que no terminaría de mencionar una por una a las personas que estuvieron involucradas en estos años y que directa o indirectamente favorecieron a que pudiera terminarse éste trabajo, pero les estoy plenamente agradecida.

Muchas gracias!

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	xiii
INDICE DE FIGURAS	xv
ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xviii
CAPITULO I	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.2 Epidemiología de enfermedades respiratorias agudas	2
1.1.3 Influenza	3
1.1.3.1 Epidemiología de Influenza en México	4
1.1.3.2 Historia Natural de la Enfermedad: Influenza	6
1.1.3.3 Tratamiento en pacientes con infección por VI	8
1.1.3.4 Biología Molecular del Virus de la Influenza.....	10
1.1.3.5 Filogenia del Virus de la Influenza	13
1.1.3.6 Vacunación para Influenza	18
1.1.3.7 Período Post Pandémico en México	20
CAPITULO II	
2. HIPÓTESIS	24
CAPITULO III	
3. JUSTIFICACIÓN	25

CAPITULO IV

4. OBJETIVOS	28
--------------------	----

CAPITULO V

5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Clasificación del estudio	30
5.2. Población del estudio	30
5.2.1 Criterios de inclusión	31
5.2.2 Criterios de exclusión	31
5.3 Método de reclutamiento	32
5.4 Toma de muestra	32
5.5 Recolección de datos clínicos	33
5.5.1 Estadística de datos clínicos	34
5.6 Obtención de ácidos nucleicos para análisis	35
5.6.1 Extracción de ARN	35
5.6.2 Amplificación por PCR	36
5.6.3 Secuenciación	38
5.7 Análisis de datos	40
5.7.1 Análisis estadístico	40
5.7.2 Análisis filogenético	41

CAPITULO VI

6. RESULTADOS	43
6.1 Epidemiología de la infección por VI 2009 a 2014.....	43
6.2 Temporada 2016-2017	59

6.2.1 Análisis epidemiológico	59
6.2.2 Análisis filogenético	61
6.2.3 Análisis de resistencia antiviral	69
CAPITULO VII	
7. DISCUSIÓN	71
CAPITULO VIII	
8. CONCLUSIONES	79
CAPITULO IX	
9. ANEXOS	81
CAPITULO X	
10. BIBLIOGRAFÍA	88
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos notificados de Influenza en México de 2006 a 2013 y su clasificación	5
Tabla 2. Subtipos de virus de la influenza reportados en México	6
Tabla 3. Tratamientos de elección en Influenza	9
Tabla 4. Síntomas clínicos recolectados en pacientes con infección por VI ...	33
Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación RT-qPCR de VI.....	37
Tabla 6. Reactivos y volúmenes utilizados para el master mix en la reacción de secuenciación de VI	38
Tabla 7. Protocolo de temperaturas y ciclos para la reacción de secuenciación de VI (Genes HA, NA y M)	39
Tabla 8. Primers utilizados para reacción de secuenciación de VI (Genes HA, NA y M)	39
Tabla 9. Porcentaje de pacientes con infección por VI, agrupados por género y temporada.....	44
Tabla 10. Frecuencia de pacientes infectados por VI por rango de edad	44
Tabla 11. Características clínicas de los pacientes infectados por VI en las temporadas 2009-2014.....	45
Tabla 12. Características clínicas de los pacientes infectados por VI clasificados por subtipo.....	49

Tabla 13. Porcentaje de pacientes confirmados con infección por VI clasificados por subtipo viral.....	53
Tabla 14. Composición de las vacunas para influenza utilizadas en México por temporada	54
Tabla 15. Características clínicas de los pacientes infectados por VI durante las temporadas 2009-2014 clasificados por subtipo viral	58
Tabla 16. Sintomatología por tipo de atención en pacientes infectados con VI durante las temporadas 2009-2014.....	60
Tabla 17. Mortalidad en pacientes hospitalizados por infección con VI	60
Tabla 18. Síntomas presentados en los pacientes infectados con VI temporada 2016-2017	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de infecciones por VI durante 2008.....	2
Figura 2. Número de casos confirmados por laboratorio de pacientes infectados por virus de Influenza A (H1N1)	4
Figura 3. Mecanismo de acción de fármacos utilizados en infección por VI....	10
Figura 4. Biología Molecular del VI	11
Figura 5. Variabilidad del VI adquirida por recombinación	15
Figura 6. Variabilidad genética del subtipo H3N2 humano	17
Figura 7. Distribución geográfica de casos confirmados en el estado de Nuevo León durante las temporadas 2009-2014.....	48
Figura 8. Distribución de casos por grupo de edad 2009-2014	52
Figura 9. Porcentaje de pacientes confirmados con infección por VI, por subtipo, durante cada temporada (2009-2014).....	53
Figura 10. Comparativa de edades y tipo de tratamiento en pacientes infectados con VI durante las temporadas 2009-2014	55
Figura 11. Número de pacientes con infección por VI con tratamiento Ambulatorio vs Hospitalizados por temporada (2009-2014).....	56
Figura 12. Árbol filogenético de VI correspondiente a proteína de matriz.....	62
Figura 12. Árbol filogenético de VI correspondiente a Hemaglutinina.....	65
Figura 13. Secuencia correspondiente al gen de neuraminidasa (NA) donde se detallan las mutaciones buscadas para determinar la Resistencia antiviral	70

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Centígrados / Grados Celsius
CDC	Centers of Disease Control
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ETI	Enfermedad Tipo Influenza
FDA	Food and Drug Administration
GISAID	Iniciativa Global para Compartir Datos sobre la Gripe Aviar
HA	Hemaglutinina
IRAG	Infección respiratoria aguda grave
LAIV	Vacuna contra la Influenza atenuada en virus vivos
LESPNL	Laboratorio estatal de salud pública del estado de Nuevo León

μL	Microlitros
NA	Neuraminidasa
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
OMS	Organización Mundial de la Salud
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
TIV	Vacuna Inactivada Trivalente contra la Influenza
VI	Virus de la Influenza
WHO	World Health Organization

RESUMEN

La influenza es una infección viral altamente contagiosa que afecta el tracto respiratorio, es causada por el virus influenza A, B y C, de los cuales, influenza A ha sido asociado a pandemias e infecciones graves en los seres humanos.

Los virus de influenza A tienen una tasa alta de mutaciones, lo cual confiere al virus una ventaja selectiva al permitir la evasión del sistema inmune del hospedero causando así variaciones en la presentación clínica de los pacientes e incluso permitiendo presentaciones clínicas severas de la enfermedad.

Los subtipos virales A H1N1, A H3N2 y ambos linajes de Influenza B (Victoria y Yamagata) han afectado a la población mexicana en los últimos años.

Por tal motivo el presente estudio tiene como objetivo determinar las características epidemiológicas de las infecciones por VI en el noreste mexicano, determinando los factores de riesgo para enfermedad grave y hospitalización. Para este propósito, se incluyeron 3,482 pacientes con diagnóstico confirmado por RT-PCR de Octubre 2009 a Diciembre 2014 en el estado de Nuevo León, se recolectaron muestras de exudado nasofaríngeo en estos pacientes para confirmar diagnóstico por RT-PCR, se aisló el genoma viral y se recolectó la historia clínica de los pacientes para realizar la caracterización clínica. Se agregaron 18 pacientes más de la temporada 2016-2017, en los cuales se realizó una secuenciación parcial del genoma y

posteriormente se utilizó el software MEGA 6 para inferir la filogenia y asociarla a la sintomatología en los pacientes.

El subtipo A H1N1pdm (pandémica) de VI fue el responsable de 52% de los casos en el presente estudio, A H3N2 del 27% y VI B del 12% de los casos.

Un total de 75% de los pacientes (2,611) tuvo tratamiento ambulatorio para la enfermedad, mientras que 25% (871) fue hospitalizado. El número de pacientes hospitalizados fue variable entre las temporadas de influenza. Un mayor número de comorbilidades (64% con EPOC, 60% con IRC y 51% con Diabetes) se observó en los pacientes que fueron hospitalizados contra los que llevaron tratamiento ambulatorio. Del total de pacientes que refirieron vacunación, solo el 18% fue hospitalizado, en contraste con el 27% de los no vacunados que requirieron también hospitalización.

El análisis filogenético de las secuencias de HA de la temporada 2016-2017 permitió agrupar las muestras en dos clados, uno correspondiente a virus que comenzaron a circular desde enero de 2017 en Estados Unidos, el otro con reportes de aparición desde Noviembre de 2016; Con esto se encontró que a pesar de que el subtipo correspondía a A (H1N1) había algunas variaciones en las secuencias del genoma correspondiente a la proteína de matriz, las cuales se asocian a variaciones en la sintomatología que presentaron los pacientes.

Esta caracterización toma relevancia en el contexto de la pandemia por la COVID-19, ya que se vuelve fundamental el diagnóstico diferencial entre ambos tipos de infecciones con sintomatología respiratoria similar.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 - Antecedentes:

Las infecciones respiratorias agudas son patologías que afectan el tracto respiratorio desde la faringe proximal hasta los pulmones, generalmente, con una evolución de menos de 15 días y constituyen la causa más frecuente de morbi-mortalidad en el mundo, llegando hasta los 4 millones de muertes por año a nivel mundial. Los virus de influenza (VI), representan una de las causas más comunes de infecciones respiratorias agudas, altamente contagiosas y con consecuencias potencialmente fatales. Los VI se presentan cada año de manera estacional causando aproximadamente de 3 a 5 millones de casos graves y 290 000 a 650 000 muertes. Sin embargo, cada cierto tiempo, principalmente por mutaciones en el genoma viral, se presentan pandemias relacionadas a la infección por el virus, la más actual en 2009. La pandemia de 2009, marca un antes y un después en las estrategias de vigilancia

epidemiológica de las infecciones por VI, enfatizando la subtipificación y el establecimiento de la filogenia.



A Weekly Influenza Surveillance Report Prepared by the Influenza Division

Influenza-Like Illness (ILI) Activity Level Indicator Determined by Data Reported to ILINet

This system monitors visits for ILI (fever and cough or sore throat), not laboratory confirmed Influenza and may capture patient visits due to other respiratory pathogens that cause similar symptoms.

2008-09 Influenza Season Week 41 ending Oct 11, 2008



*This map uses the proportion of outpatient visits to healthcare providers for influenza-like illness to measure the ILI activity level within a state. It does not, however, measure the extent of geographic spread of flu within a state. Therefore, outbreaks occurring in a single city could cause the state to display high activity levels.

*Data collected in ILINet may disproportionately represent certain populations within a state, and therefore may not accurately depict the full picture of influenza activity for the whole state.

*Data displayed in this map are based on data collected in ILINet, whereas the State and Territorial flu activity map are based on reports from state and territorial epidemiologists. The data presented in this map is preliminary and may change as more data is received.

*Differences in the data presented by CDC and state health departments likely represent differing levels of data completeness with data presented by the state likely being the more complete.

*For the data download you can use Activity Level for the number and Activity Level Label for the text description.

*This graphic notice means that you are leaving an HHS Web site.

For more information, please see CDC's Exit Notification and Disclaimer policy.

For more information on the methodology, please visit Outpatient Illness Surveillance methods section.

Figura 1. Prevalencia de infecciones por VI en Estados Unidos durante 2008, para representar la incidencia en el hemisferio norte, previa a la pandemia en 2009 (tomado de www.cdc.gov)

1.1.2 Epidemiología de enfermedades respiratorias agudas.

En México las Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs) representan el principal motivo de consulta en primer nivel de atención, superando 25 millones de consultas por año, de acuerdo a los anuarios de morbilidad de la

Dirección general de epidemiología en México; En el estado de Nuevo León también representa el principal motivo de consulta en primer nivel de atención con alrededor de 1; 100,000 consultas por año. ²

Las infecciones respiratorias agudas pueden ser de etiología viral, bacteriana o micótica, siendo la viral la de mayor porcentaje, aproximadamente 90% de éstas; entre los agentes etiológicos de tipo viral más frecuentemente aislados en pacientes, se encuentran el SARS- CoV-2, Virus Sincicial Respiratorio, Adenovirus, Parainfluenza y Virus de la Influenza (VI). ¹

1.1.3 Influenza

La influenza es una enfermedad viral importante, causada por virus de la influenza tipo A, B o C y que afecta principalmente a animales, sin embargo, debido a la capacidad de mutación y evolución constante del virus, ha afectado a humanos también causando pandemias registradas desde 1889, hasta la más reciente en 2009 con el virus Influenza A (H1N1). ³

Al estudiar el comportamiento de la influenza en los últimos 10 años se encontró una regularidad de aparición estacional de 2003 a 2008, Sin embargo a partir de Abril de 2009 y hasta el 10 de Agosto de 2010 la WHO (World Health Organization) declaró una Pandemia relacionada al virus A (H1N1) con cifras de 43-89 millones de infectados y una estimación de entre 151,700 a 575,400 muertes relacionadas a la infección a nivel mundial durante su primer año de circulación. ^{3, 4, 5, 6}

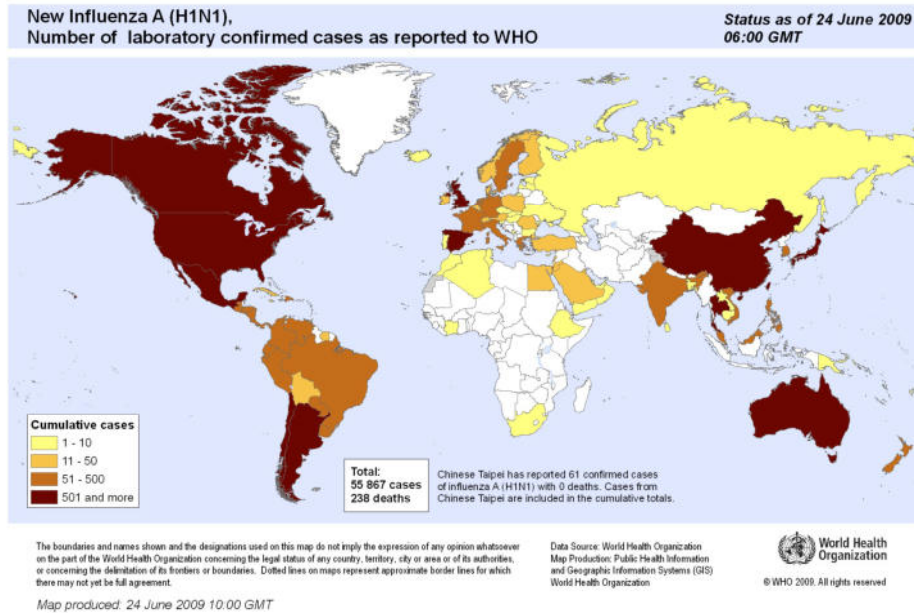


Figura 2. Número de casos confirmados por laboratorio de pacientes infectados por virus de Influenza a (H1N1) a nivel mundial reportados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en Junio de 2009

Fuente: World Health Organization

1.1.3.1 Epidemiología de Influenza en México

La temporada de influenza en México comprende de la semana 40 de un año en curso hasta la semana 20 del año siguiente.^{7,8} Con un promedio de notificación, en los años de 2003 a 2008, de 237 casos por temporada, sin identificar subtipo. ^{2,7}

A raíz de la pandemia A (H1N1) en 2009 se comenzó un estricto control epidemiológico, con notificación inmediata de enfermedad tipo influenza (ILI) para posteriormente confirmar el diagnóstico y buscar identificar el subtipo, sin embargo los resultados tardan en regresar a la institución notificante y no tienen efecto en la elección del tratamiento.^{7,8} Según la Dirección General de

Epidemiología en su anuario de morbilidad del año 2009 se notificaron 241, 845 casos de los cuales se aisló el virus A (H1N1) en 70, 240 casos y el de Influenza A Estacional 28, 713 casos, quedando 142, 892 muestras sin subtipificar. ²

Actualmente la vigilancia epidemiológica de la influenza en México se realiza de acuerdo a los lineamientos de la OMS, y los análogos de la CDC, es decir, bajo las estrategias de tipo centinela y sindromática, posterior confirmación por laboratorio para conocer la positividad de casos y su subtipificación, con método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR).⁸

Año	Casos Notificados	Influenza Tipo B, Influenza A (H3N2)	A (H1N1)	Sin identificar
2013	1,857	1,782	75	0
2012	13,397	1,182	3,043	9,172
2011	16,567	2,197	3,127	11,243
2010	19,726	1,799	2,370	15,557
2009	241,845	28,713	70,240	142,892
2008	166	0	0	166
2007	390	0	0	390
2006	97	0	0	97

Tabla 1. Casos notificados de Influenza en México de 2006 a 2013 y su clasificación

Fuente: Anuarios de Morbilidad 2003-2012, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México; Notificaciones semanales, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud México

De todos los casos notificados en México, el 8.6% de acuerdo con la Dirección General de Epidemiología de México, corresponde a los estados del noreste del

país (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas), siendo de ellos Nuevo León el principal con 8.4% de los casos.²

Temporada invernal	No. de muestras	Positivos de influenza tipo:			Total de positivos
		(H1N1)	“A”	“B”	
2009-2010	5,201	4,485	459	17	4,961
2010-2011	3,433	12	1,042	79	1,133
2011-2012	1,868	442	30	11	483
2012-2013	791	3	190	232	425

Tabla2. Subtipos de virus de la influenza reportados en Nuevo León Fuente: Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León, información al 6 de Julio de 2013

1.1.3.2 Historia Natural de la Enfermedad: Influenza

La influenza en humanos se presenta principalmente por los Virus de Influenza tipos A y B, en nuestro país, actualmente, los principales en pacientes son el A(H1N1), A(H3N2) y Tipo B. ⁹

La principal forma de trasmisión de la enfermedad es el contagio de persona a persona, a través de gotas que quedan suspendidas en el aire después de que un paciente con influenza tose o estornuda; El virus se conserva estable a temperaturas menores a los 27°C y se mantiene en superficies sólidas hasta 90 minutos, por lo cual es posible adquirir la infección cuando se tocan objetos contaminados con gotitas provenientes de un paciente infectado y se llevan a la boca o nariz sin lavarse previamente las manos. ^{10, 11,12}

El período de incubación del virus de la Influenza es de 24-48 horas; El virus afecta en primer lugar a las células del sistema respiratorio para la replicación de su genoma, éste proceso dura entre 4 y 6 horas; Los síntomas se presentan en las primeras 72 horas, siendo éstos fiebre, generalmente mayor a los 39°C, tos seca, odinofagia, mialgia, secreción nasal abundante y hialina, cefalea intensa, escalofríos, astenia, adinamia, dolor retro ocular y dificultad respiratoria. ^{10,11, 12}

La recuperación completa ocurre en la mayor parte de los casos tratados a tiempo, sin embargo, un pequeño porcentaje de pacientes cursa con complicaciones agudas o crónicas lo cual desemboca a la muerte del paciente. Los grupos de riesgo que tienen mayor probabilidad de sufrir complicaciones graves, son niños menores de cinco años, adultos mayores de 65 años, inmunodeprimidos (infección por VIH, cáncer, quimioterapia, tratamiento inmunosupresor), portadores de enfermedades crónicas (asma, EPOC, fibrosis quística, daño pulmonar crónico, diabetes mellitus, cardiopatías, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal crónica, enfermedad neuromuscular, epilepsia o déficit cognitivo, enfermedad hepática crónica), embarazadas, pacientes institucionalizados. ^{10, 11, 12}

1.1.3.3 Tratamiento en pacientes con infección por VI

El tratamiento para la Influenza en humanos se basa en tratamiento sintomático y los fármacos antivirales.

Los antivirales de elección para Influenza humana son Amantadina, Rimantadina, Oseltamivir y Zanamivir.

Los virus de influenza A(H1N1)2009, A(H3N2) e influenza B son susceptibles a los inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir), por lo tanto son los medicamentos de primera elección para su tratamiento, además, los virus de influenza suelen ser resistentes a amantadina y rimantadina, por su empleo indiscriminado previo a la pandemia de 2009. En la tabla 3 se resumen los tratamientos de elección y la dosis establecida por la OMS/CDC a partir de Junio 2009, posterior a la aparición a A(H1N1)pdm, y que son utilizados en la actualidad.

Población y medicamento		Tratamiento	Quimioprofilaxis
Oseltamivir			
Adultos		75 mg (cápsula) cada 12 horas por 5 días	75 mg (cápsula) cada 24 horas por 10 días
Niños (edad: 12 meses o más), peso de:	15 kg o menos	30 mg cada 12 horas por 5 días	30 mg cada 24 horas por 10 días
	>15–23 kg	45 mg cada 12 horas por 5 días	45 mg cada 24 horas por 10 días
	>23–40 kg	60 mg cada 12 horas por 5 días	60 mg cada 24 horas por 10 días
	>40 kg	75 mg cada 12 horas por 5 días	75 mg cada 24 horas por 10 días
Zanamivir			
Adultos		Dos inhalaciones de 5 mg (10 mg total) cada 12 horas por 5 días	Dos inhalaciones de 5 mg (10 mg total) cada 24 horas por 10 días
Niños		En niños de 7 años o más: Dos inhalaciones de 5 mg (10 mg total) cada 12 horas por 5 días	En niños de 5 años o más Dos inhalaciones de 5 mg (10 mg total) cada 24 horas por 10 días

Tabla 3: Tratamientos de elección en Influenza. Fuente: Guías de Práctica clínica México, CENETEC (Cuadro extraído de la Guía IDSA para la influenza estacional)/ Basado en las recomendaciones de la OMS Agosto 20, 2009.

A partir de Febrero de 2018 la FDA aprobó en Estados Unidos el uso del fármaco Baloxavir Marboxil, el cual fue aprobado por la COFEPRIS para su administración en México en octubre de 2018 bajo el nombre comercial XOVLUZA.

A diferencia de Osetamivir y Zanamivir, Baloxavir pertenece a la familia de fármacos denominados *inhibidor de la endonucleasa cap-dependiente*, este fármaco se administra en monodosis (40-80mg) hasta 48 horas posterior al

inicio de síntomas en mayores de 12 años y menores de 64 años para tratar Influenza leve a moderada, y puede ser de utilidad en caso de aparición de resistencia a fármacos inhibidores de NA.

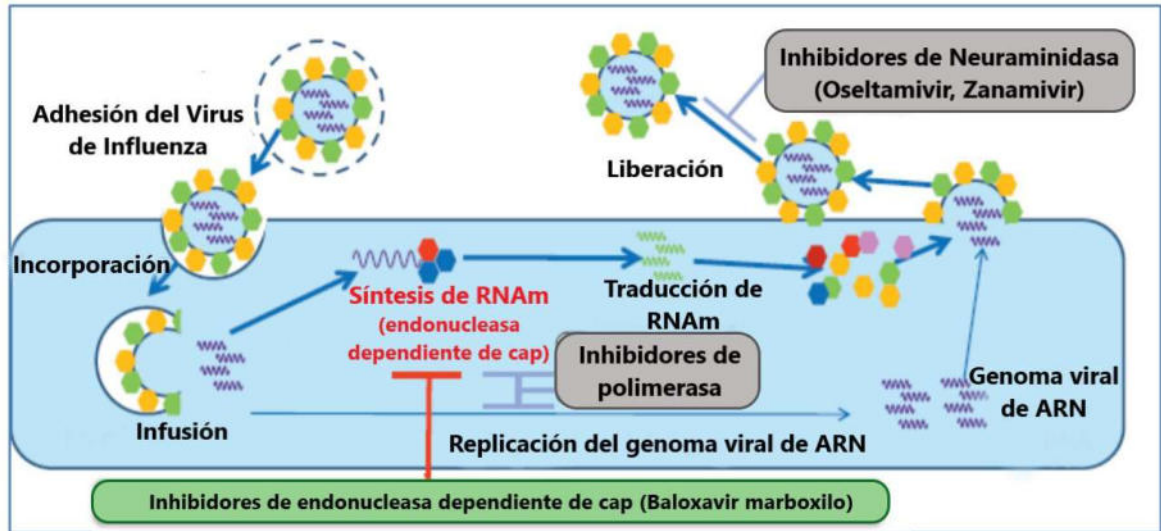


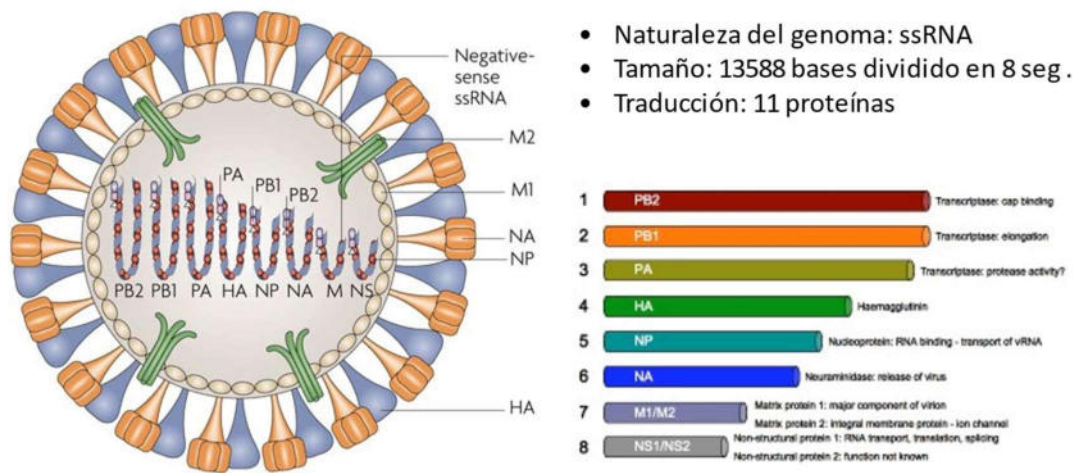
Figura 3. Mecanismo de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de infección por virus de influenza. Inhibidores de endonucleasa dependiente de cap vs Inhibidores de Neuraminidasa

1.1.3.4 Biología Molecular del Virus de la Influenza

El virus de la Influenza tiene 3 tipos, A, B y C, siendo el tipo B el que tiene mayor preferencia a afectar humanos, sin embargo, el tipo A es el más comúnmente encontrado en infecciones pandémicas.

El virus de la Influenza tipo A pertenece a la familia Orthomixoviridae, su genoma es de ARN de cadena sencilla, con una longitud de 13,588 bases, dividido en 8 segmentos que codifican para 11 proteínas, está constituido por una envoltura, una matriz y una ribonucleoproteína; 18,19

Biología molecular del virus de la influenza (VI)



Nature Reviews | Genetics

Nelson MI, Holmes EC. Nature Reviews
Genetics 8, 196-205 (March 2007)

Figura 4. Biología Molecular del VI: Estructura del Virus de influenza, distribución de los segmentos que conforman su genoma y proteínas codificadas.

1.- La envoltura está conformada por una doble capa de lípidos, la cual se adquiere de la célula hospedera y en la que se insertan 3 proteínas virales principalmente²¹

A) Hemagglutinina; La cuál media la unión y entrada del virus a la célula blanco, y además es la parte del virus a la cual se dirigen principalmente los anticuerpos.

B) Neuraminidasa; Glucoproteína tetramérica, la cual permite la propagación del virus en el epitelio respiratorio.

C) M2; La cuál permite que el genoma se libere en el interior de la célula hospedera e inicie la multiplicación del virus.

Al momento de clasificar los virus de la influenza tipo A se utilizan las proteínas Hemagglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA), actualmente hay descritos 16 subtipos de HA (H1, H2, etc.) y 9 subtipos de NA (N1, N2, etc.), un ejemplo es la clasificación del virus aislado en la pandemia de 2009, Influenza Tipo A H1N1. Es importante esta clasificación debido a que con el subtipo cambia el rango de hospedero, la resistencia a antivirales y la virulencia.^{18,19,20,21}

2.- La matriz o cápside es la capa intermedia y consta principalmente de dos proteínas:

A) M1; la cual se asocia con la hemagglutinina de la envoltura.

B) NS2 o NEP; La cual transporta el genoma viral dentro de la célula y también participa en la multiplicación del virus.

3.- La ribonucleoproteína contiene el genoma viral, el cual consiste en ARN de cadena sencilla con polaridad negativa y tiene una longitud de 13588 bases, se encuentra dividido en 8 segmentos, cada uno de los cuales codifica para al

menos una proteína, dando un total de 11, incluyendo proteínas estructurales y no estructurales, las cuales son indispensables en el proceso de multiplicación viral (Fig. 3).^{18, 19, 20, 21}

1.1.3.5 Filogenia del Virus de la Influenza

El RNA es un ácido nucleico más antiguo que el DNA de doble hélice, y se replica en el hospedero gracias a la RNA polimerasa viral, enzima que cataliza la replicación del virus en la célula hospedera, dicha enzima (RNA polimerasa viral) está formada por tres subunidades, PA, PB1 y PB2. Cada una de éstas subunidades se encuentran codificadas en segmentos distintos del genoma viral. Otros dos segmentos codifican para la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), las proteínas que se encuentran en la superficie del virus.^{9,76}

En los virus, los genomas de RNA de una sola hebra tienen una tasa de mutaciones aproximadamente un millón de veces mayor que la del DNA de doble hélice, que es el material genético de nuestras células y todos los demás seres vivos.⁹ Las fuentes de variabilidad biológica de genomas segmentados de RNA de una sola hebra, como los del virus A (H1N1) son^{9,76}:

a) Las bases nucleotídicas del RNA, cuya secuencia constituye el mensaje genético del virus, pueden sufrir una serie de reacciones químicas al entrar en

contacto con el medio acuoso del interior de una célula cuando ésta es infectada;

b) La RNA polimerasa lee y replica los segmentos de RNAs que forman el genoma del virus, pero introduce un número considerable de errores que no son corregidos porque carece de la actividad correctora que se observa en las enzimas involucradas en la replicación del DNA;

c) La recombinación que se produce cuando dos o más virus diferentes infectan una misma célula y se da un intercambio al azar de los segmentos del RNA

d) Los segmentos del RNA viral no presentan las llamadas secuencias simples, que son zonas del genoma con repetición de bases, y que en otros virus como el VIH son una fuente de variabilidad genética. ^{16,17,19}

La variabilidad en los subtipos de VI a través del tiempo, depende de dos principales cambios antigénicos en el genoma viral, denominados “Drift”, es decir cambios puntuales, o menores, correspondientes a la acumulación de mutaciones pequeñas en los fragmentos del ARN que traducen a NA o HA; y “Shift”, o cambios mayores, que implican la captación de una hemaglutinina o neuraminidasa desde otros subtipos. ^{9,17,19,76}

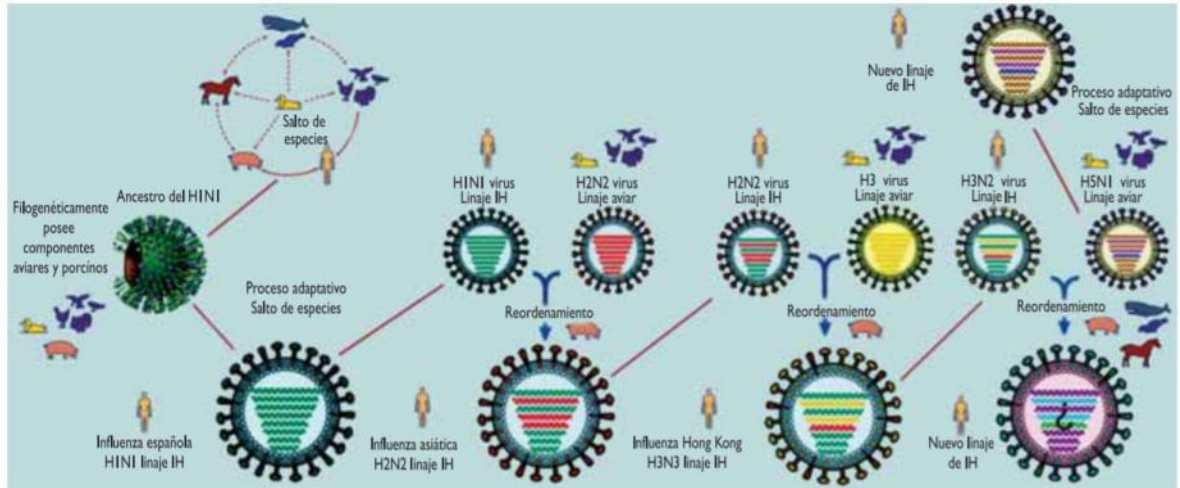


Figura 5. Variabilidad del virus de influenza adquirida por recombinación. Drift y shift, que permite la aparición de nuevos subtipos por combinación de variables aviarias, porcinas y humanas; Osorio-Plenge, Fernando, Cabezas-Sánchez, César, Gómez-Benavides, Jorge, & Maguiña-Vargas, Ciro. (2006). Influenzas humana y aviar: amenaza de una pandemia humana. *Acta Médica Peruana*, 23(1), 35-47.

Estudios sobre la evolución del virus a través del tiempo han demostrado que la HA en la superficie del virus de la influenza es el antígeno principal que provoca la respuesta inmune del hospedero, y también es responsable de mediar en la entrada del virus en las células hospederas; Las células diana para VI son las células del epitelio respiratorio, las cuales tienen receptores específicos que contienen ácido siálico, según la posición que tengan en su enlace con una galactosa de la membrana celular se dividen en dos tipos; los alfa 2,6 y los alfa 2,3. Los receptores alfa 2,6 están presentes en gran cantidad en el epitelio ciliado de la mucosa nasal, paranasal, faríngea, tráquea y bronquios y en la conjuntiva ocular. Los receptores alfa 2,3 se encuentran en las células no ciliadas de bronquiólos y alvéolos. Los VI humanos tienen una alta afinidad por

los receptores alfa 2,6 y los VI aviares por los receptores alfa 2,3. Los cerdos tienen ambos receptores en la vía aérea, por lo cual pueden coinfectarse simultáneamente y por reordenamiento producir un nuevo virus.

La HA al unirse a los receptores de membrana, se fija, y los viriones quedan recubiertos de ácido siálico, favoreciendo la entrada a más células respiratorias.

En años recientes con la expansión de métodos disponibles para análisis moleculares se han desarrollado árboles filogenéticos que sugieren que las secuencias de HA de virus circulantes comprenden combinaciones de secuencias de virus desde el año 1918, que permiten que el virus evada la respuesta inmune inducida por las vacunas de influenza estacional que sólo utilizan secuencias aisladas en años recientes sin combinar, es decir cambios en la secuencia del genoma que codifica para HA, por lo que no se producen anticuerpos neutralizantes específicos que eviten la unión de la HA al ácido siálico, por lo cual la partícula viral continúa su endocitosis en las células del epitelio respiratorio. ²⁶

La enorme variabilidad genética del virus A (H1N1) implica que sus poblaciones se deben considerar como una unidad evolutiva que no es simplemente la suma de las propiedades de sus componentes individuales. Por esta razón es importante establecer un sistema de vigilancia epidemiológica basado en las relaciones filogenéticas entre los virus circulantes.

El monitoreo continuo de la composición molecular de los virus circulantes permite rastrear la evolución del virus y su posterior transmisión, es decir,

permite establecer los cambios y recombinaciones en los hospederos como aves y cerdos, como se mencionó por los receptores de ácido siálico presentes en ésta última especie, que permiten que los subtipos humanos, al estar recombinados, sean más infecciosos y/o letales. Además de identificar las áreas geográficas en las cuales circula cada subtipo viral, lo cual influye en la composición anual de las vacunas de cada región. 15, 16, 17, 19

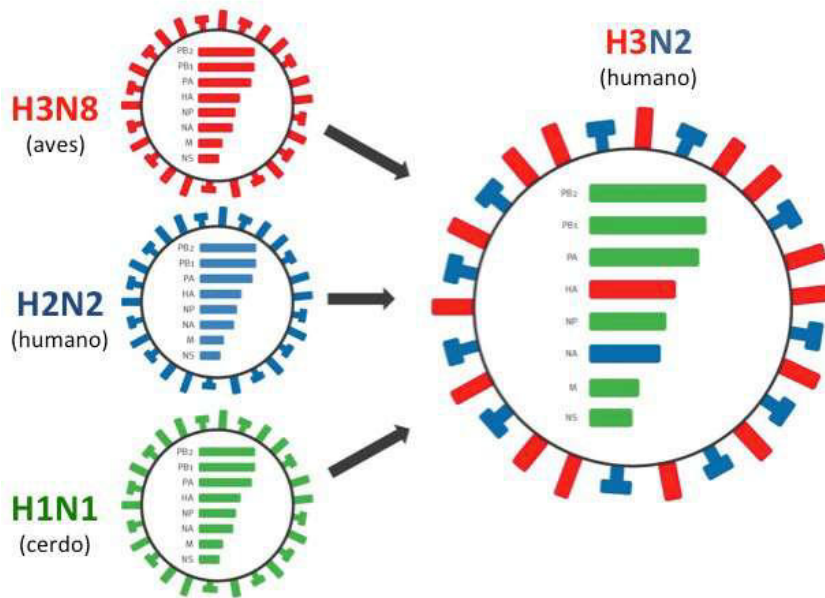


Figura 6. Variabilidad genética del subtipo H3N2 humano, por recombinación de genoma en diferentes hospederos (ave, humano, cerdo)

1.1.3.6 Vacunación para Influenza

La vacunación contra la influenza estacional es la forma más importante de prevenir las infecciones por este virus y las complicaciones severas potenciales, incluyendo la muerte. La vacunación contra la influenza estacional reduce las posibilidades padecerla o transmitirla a otros. ⁸

Posterior a la Pandemia de Influenza en 2009, el virus se estableció en el periodo post-pandémico en el cual el predominio a nivel mundial fue el de la Influenza A(H3N2) y los virus de Tipo B. ^{6, 8, 22}

Sin embargo, a partir de finales del 2011 e inicio del 2012 el subtipo prevalente en los períodos estacionales de Influenza en México y la mayor parte de Centro América fue el A(H1N1) ^{6, 8, 22}

Estos cambios epidemiológicos afectarían la efectividad de las vacunas de Influenza en estas poblaciones.

La vacuna contra la influenza estacional utilizada en México a partir del año 2012-2013 protege contra el virus de influenza A H3N2 el virus de la influenza B y el virus A (H1N1)2009. ⁸

Hay dos tipos de vacunas contra la influenza estacional con licencia de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA):

A) La vacuna de VI inactivada: el año pasado (Temporada 2020-2021) se utilizó en México la vacuna inactivada trivalente contra la influenza (TIV), la cual

incluía AH3N2, AH1N1pdm y B linaje Victoria, durante esta temporada (2021-2022) en México se estará aplicando la vacuna trivalente en el sector público y la tetravalente en el medio privado; La tetravalente también inactivada, contiene AH3N2, AH1N1, B Linaje Victoria y B Linaje Yamagata.

B) La vacuna contra la influenza atenuada en virus vivos (LAIV), esta no está disponible en México en sector público, ni en sector privado^{23, 24, 25}

C) La vacuna recombinante contra la influenza, esta fue aprobada para usar en Estados Unidos en 2013, este tipo de vacunas no necesitan un virus candidato cultivado en huevo ni usa huevos de gallina en el proceso de producción, además, evita las mutaciones que pueden producirse cuando los virus se cultivan en huevo, que a veces pueden afectar la eficacia de la vacuna terminada. Existe una sola vacuna inyectable tetravalente recombinante contra la influenza (Flublok Quadrivalent) disponible para la temporada de influenza 2021-2022, exclusivamente para los Estados Unidos

Tanto la LAIV como la TIV de temporada contienen al menos tres cepas de virus de influenza, un virus de la influenza A (H3N2), un virus de la influenza A (H1N1) y al menos uno de la influenza B (la vacuna tetravalente de esta temporada contiene los 2 linajes principales de Influenza B, Victoria y Yamagata). Cada año, antes de que comience la temporada de influenza, una o más cepas de virus incluidos en la vacuna, son modificados basándose en la vigilancia mundial de los virus de la influenza y la aparición y la diseminación de nuevas cepas, de tal manera que la vigilancia epidemiológica desempeña un papel fundamental, ya que permite seleccionar la vacuna más adecuada de

acuerdo a la prevalencia de casos por subtipo viral en una determinada región, (vigilancia de hemisferio sur para la vacunación de la temporada siguiente en hemisferio norte y viceversa) de tal manera que pueda evitar de forma importante la diseminación y propagación del virus, así como también la aparición de enfermedad grave. ^{23, 25}

En México el organismo encargado de regular la distribución de las vacunas en los sistemas de salud tanto público como privado es la COFEPRIS, sin embargo, ellos no son los encargados de fabricar las vacunas, por lo tanto, el cubrir un mayor porcentaje de la prevención por vacunación es un esfuerzo conjunto entre la Organización Mundial de la Salud, los CDC, los organismos reguladores de cada país y las farmacéuticas privadas encargadas de investigación y producción.

1.1.3.7 Período Post Pandémico en México

A partir de la experiencia adquirida en la Pandemia de A(H1N1) en México se han estandarizado las medidas a realizar en caso de brotes.

Se considerará como brote por influenza la ocurrencia de dos o más casos asociados en un contexto temporal o geográfico determinados, o la presentación de casos en frecuencia mayor a la habitual para un tiempo, lugar o personas determinadas.

Ante la presencia de brotes, los lineamientos epidemiológicos, tanto en instituciones públicas como privadas, indican:

- Levantamiento de estudio de brote y llenado de formato SUIVE-3
- Envío del formato SUIVE-3 debidamente requisitado mediante el sistema NOTINMED
- Toma de muestra solo para identificación del agente circulante
- Seguimiento del brote hasta su alta sanitaria con actualización permanente del mismo y reporte semanal del estatus a través de NOTINMED.

De acuerdo con los lineamientos de vigilancia epidemiológica para enfermedades transmisibles y laboratorios para virus en México, establecidos por la Secretaría de salud a nivel federal, y siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales como la OMS y los CDC, el análisis epidemiológico debe iniciarse según las variables de tiempo, lugar y persona y debe incluir comparaciones con periodos anteriores, con otras áreas y tendencias. Si se observan cambios en el patrón de la enfermedad será necesario realizar una investigación más detallada para definir si el cambio es real y tomar las medidas adecuadas.

Se deberá realizar análisis periódico por nivel técnico operativo y por institución, a través del Comité de Vigilancia Epidemiológica para apoyar la toma de decisiones.

Los responsables de epidemiología en todos los niveles analizarán permanentemente la información de la plataforma en línea, verificando el completo llenado de la misma y la situación de los indicadores de vigilancia epidemiológica y alerta temprana especificados en ese documento.

Si a partir de ese análisis se obtiene evidencia que sugiera un incremento en la morbilidad o mortalidad, o la presencia de nuevos tipos de virus se deberá evaluar la situación epidemiológica en el seno de los Comités Jurisdiccional y Estatal con participación de todas las áreas involucradas en la vigilancia, prevención, control y atención médica de influenza, así como todas aquellas que consideren los comités.

La información producto del proceso de recolección y análisis de los datos del país, debe ser difundida a través de reportes impresos o electrónicos que favorezcan la accesibilidad a los datos. ^{8, 13}

Cabe mencionar que no existen reportes oficiales en las instancias de salud del país que relacionen los cambios en el genoma viral y la severidad de la enfermedad por VI; Sin embargo, existen algunos estudios retrospectivos que han permitido caracterizar las infecciones por VI en México. Ruiz-Matus reportó las características de las temporadas de influenza en México, y demostró que la población no vacunada y con una o más comorbilidades, tenían mayor riesgo de infección por VI. Mata-Marín y colaboradores reportaron los factores de riesgo asociados a mortalidad en pacientes infectados con VI Ah1N1pdm en 2009, sin embargo, su trabajo incluía únicamente 11 pacientes. Fuera de esto

no existe información que reporten los factores de riesgo asociados a la hospitalización a causa de infección por VI en México.

CAPITULO II

HIPÓTESIS

2.1.- Hipótesis de trabajo:

Los virus de Influenza circulantes en Nuevo León son los mismos que circulan en el resto de la región Noreste de México y son los que se incluyen en la vacuna anual de temporada.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

En padecimientos como la influenza cuyo espectro clínico es sumamente amplio y que puede ser confundido con una gran cantidad de padecimientos respiratorios que resultan en notificaciones parciales o incompletas y en la gran mayoría sin un diagnóstico de laboratorio, la información disponible en los diarios epidemiológicos es poco fiable e incompleta, presentando únicamente una cuantificación de casos de infección por VI, ésta no es la mejor estrategia para la vigilancia epidemiológica, ya que no se cumpliría con los objetivos generales del sistema de vigilancia planteados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), no se contaría con información confiable para hacer recomendaciones sobre actualizaciones al tratamiento, fabricación de vacunas, e inclusive los algoritmos para tratamiento. Resulta de suma importancia, además de la cuantificación de casos, la caracterización clínica de los pacientes infectados, permitiendo identificar los factores de riesgo para hospitalización, en especial en nuestro país, en el cuál el acceso a los servicios de salud es limitado en una gran parte de la población, además de la identificación del porcentaje de vacunados por temporada, con el objetivo de mejorar las

campañas de vacunación en el país, favoreciendo la prevención y evitando el gran número de días/cama de pacientes en edad productiva, lo cual tiene como consecuencia importantes pérdidas económicas.

La OMS recomienda realizar la vigilancia epidemiológica de influenza mediante el establecimiento de un sistema de vigilancia en unidades o sitios centinela, orientados a detectar casos de ETI y de IRAG. En estas unidades se debe garantizar la detección de los casos, obtención de muestras y diagnóstico de laboratorio para la tipificación y subtipificación viral; lo anterior permite monitorear los virus circulantes para la recomendación de la composición de las vacunas, medir la sensibilidad a los antivirales y la evaluación de riesgos epidemiológicos, que permitan detectar la aparición de virus de influenza con potencial pandémico.

Si bien la temporada de influenza empieza en la semana 40 de un año y termina en la semana 20 del siguiente año la vigilancia se debe mantener todo el año.

Dentro de las áreas de oportunidad derivadas de la epidemia 2009, para evitar graves problemas económicos, ausentismo laboral y pérdidas de productividad, puede resaltarse la necesidad de encausar la estrategia de la vigilancia, a través de una vigilancia centinela, tal como se hace en otros países, que nos permita conocer los virus circulantes y caracterizar la enfermedad para la toma de decisiones oportunas y mitigar el daño en la población.

Aunado a ésta situación, derivado de la pandemia mundial de COVID-19, que nos ha mantenido con restricciones de movilidad, pérdida de empleos, trabajo a distancia y atraso educativo por casi 18 meses, podemos aprender como mutaciones puntuales en genomas virales pueden derivar en una pérdida de control en los sistemas de salud y un aumento en el número de casos y muertes derivadas de infecciones virales y la necesidad de planes de algoritmos diagnósticos, caracterizaciones epidemiológicas y planes de salud pública enfocados en la prevención, por lo cual la descripción de características clínicas y epidemiológicas en influenza, puede favorecer la realización de esto, no exclusivamente en las infecciones por VI, si no en otras infecciones virales de presentación respiratoria, permitiendo un correcto diagnóstico diferencial y abordaje de tratamiento.

CAPITULO IV

OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar los virus de influenza (VI) circulantes en Nuevo León y establecer la relación filogenética con los virus circulantes en otras regiones de México.

4.2 Objetivos Particulares

4.2.1 Realizar una descripción demográfica y clínica en pacientes del Estado de Nuevo León infectados con el virus de la Influenza durante un período de 5 años.

4.2.2 Aislar el genoma de los virus de la influenza circulantes en Nuevo León, para su posterior amplificación e identificación por RT-PCR.

4.2.3 Secuenciar parcialmente el genoma de los virus de influenza prevalentes en Nuevo León, específicamente los segmentos correspondientes a HA, NA y proteína de Matriz, para compararlos con los virus prevalentes en otras regiones en el mismo período de tiempo.

4.2.4 Establecer las relaciones filogenéticas entre los VI circulantes en Nuevo León con otras regiones.

4.2.5 Identificar si los VI circulantes en nuestra región están incluidos en la vacuna disponible en los respectivos años del estudio.

CAPITULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Clasificación del estudio

El estudio epidemiológico de nuestra población fue observacional, transversal, descriptivo y comparativo

5.2 Población del estudio

Se obtuvieron muestras y datos de 3482 pacientes del noreste de México en el periodo 2009 a 2014, para realizar un análisis estadístico y epidemiológico, además se incluyeron 18 pacientes de la temporada 2016-2017 para realizar secuenciación parcial del genoma (HA, NA y M) y evaluar si existe asociación clínica con cambios observados durante ésta temporada.

5.2.1 Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 18 años, sexo indistinto, mujeres en estado no grávido; Con síntomas de infección respiratoria aguda (Fiebre $>39^{\circ}\text{C}$, Rinorrea, Estornudos, Malestar General, Dificultad Respiratoria) y que hubieran llenado la carta de consentimiento informado para toma de muestra y recolección de datos clínicos. Se incluyen menores de 18 años, para análisis epidemiológico, únicamente cuando ya se cuenta con la muestra y datos clínicos proporcionados por Laboratorio estatal de salud pública del estado de Nuevo León (LESPNL) y no se requiere realizar ningún procedimiento invasivo de ningún tipo.

5.2.2 Criterios de exclusión

Pacientes que no cumplan requisitos de inclusión, pacientes que no entiendan y/o firmen la carta de consentimiento informado para la utilización de muestras y la revisión de expediente clínico, pacientes que no deseen participar en el estudio.

5.3 Método de reclutamiento

En colaboración con el departamento de virología del LESP NL se colectaron muestras y datos clínicos del período 2009-2014, para las muestras de la temporada 2016-2017 se reclutaron pacientes que acudieran a consulta por sintomatología tipo influenza (infección respiratoria aguda con fiebre y tos) durante la temporada del estudio a cualquier centro de salud en el estado de Nuevo León. Previo consentimiento informado se recolectaron muestras de exudado nasofaríngeo y se realizó historia clínica del paciente con énfasis en el desarrollo de la sintomatología. Se confirmó infección por virus de influenza A(H1N1) mediante RT-qPCR. Las muestras correspondientes a LESP NL fueron preservados en el departamento de virología por un año. Los datos clínicos fueron ingresados a la base de datos del laboratorio.

5.4 Toma de muestra

Se realizó frotis nasal, nasofaríngeo o de lavado bronquioalveolar según fuera más cómodo para el paciente utilizando un hisopo de rayón, posteriormente se colocó el hisopo en un tubo eppendorf que contenía 500µL de solución salina, la muestra una vez recolectada se mantuvo refrigerada a 4°C.

5.5 Recolección de datos clínicos

Previo consentimiento informado se le solicitó al paciente la narración de su cuadro clínico para fomentar la libre tribuna y se le preguntaron síntomas y datos en específico para completar el formato del estudio. Así como también se llevó a cabo una revisión minuciosa del expediente clínico para reportar cualquier dato que pudiera ser de relevancia.

Síntoma
Fiebre
Tos
Odinofagia
Disnea
Irritabilidad
Diarrea
Dolor torácico
Escalofríos
Cefalea
Mialgias
Artralgias
Malestar general
Rinorrea
Polipnea
Vomito
Dolor Abdominal
Conjuntivitis
Cianosis
Inicio subitico de síntomas
Vacunación
Tratamiento ambulatorio
Hospitalización

Tabla 4. Síntomas clínicos recolectados en pacientes con infección por VI

5.5.1 Estadística de datos clínicos

Las características clínicas y epidemiológicas fueron determinadas por interrogatorio y expediente clínico. Se realizaron asociaciones bivariadas con infección confirmada de VI, utilizando Chi cuadrada y evaluación de Fisher.

Los datos fueron analizados y se determinó que la distribución era no paramétrica, de tal manera que se utilizó la evaluación de Kruskal-Wallis para analizar variables continuas, seguido por un análisis post hoc, utilizando Mann-Whitney U aplicando la corrección de Bonferroni. Todas las variables con valores de $P \leq$ en el análisis bivariado, fueron consideradas en el modelo multivariado, el cual fue determinado utilizando regresión logística binaria y un procedimiento de selección stepwise hacia atrás con evaluación de Wald (51% de entrada, 10% de salida).

Los datos fueron ingresados y analizados utilizando el software estadístico IBM SPSS v20 (IBM Corp). Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados para indicar diferencias estadísticamente significativas.

5.6 Obtención de ácidos nucleicos para análisis

5.6.1 Extracción de ARN

Para la extracción se utilizó el QIAamp Viral RNA Mini kit de QIAGEN, ésta fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente:

En un tubo de 1.5mL se colocaron 560 μ L de amortiguador AVL con acarreador de ARN. Se agregaron 140 μ L de muestra (exudado o lavado), se mezcló por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Terminada la incubación, se agregaron 560 μ L de etanol al 100% y se mezcló por 15 segundos. Se vertieron 630 μ L de la mezcla a la columna QIAamp Mini y se centrifugó a 6000/*g* por 1 minuto. Al terminar la centrifugación, se desecha el tubo colector y se coloca uno nuevo. Se agregó el volumen de mezcla restante en la columna y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron 500 μ L de amortiguador de lavado AW1 y se centrifugó la columna a 6000/*g* por un minuto. Se desechó el tubo colector y se utilizó uno nuevo para después agregar 500 μ L de amortiguador AW2. Se realizó una nueva centrifugación, ahora a 20,000/*g* por 3 minutos. Se descartó el tubo colector y la columna se colocó en un tubo de 1.5mL donde el ARN se re suspendió con

60µL de amortiguador AVE posterior a una centrifugación de 6000/g por un minuto. El ARN extraído se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.6.2 Amplificación por PCR

Los ensayos de RT-qPCR fueron realizados utilizando el kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR de Invitrogen, CA en el sistema automatizado 7500 Fast-Real-Time PCR System de Applied Biosystems, CA, utilizando las instrucciones específicas del kit. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron para una muestra de 25 µL, 1 ciclo a 50°C por 30 minutos, para desnaturalización, un ciclo a 95°C por 2 minutos y finalmente la amplificación por 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos cada uno, buscamos valores de CT <36. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Tipo/Subtipo	Gen	Oligos	Secuencia	Pb
Influenza A(H1N1)pdm09	HA-5'(H1)	H1F1 H1R1264	AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAGC CCTACTGCTGTGAACTGTGTATTC	1264
	HA-3'(H1)	HAFA HARend	GGGAGAATGAACTATTACTGG AGTAGAAAACAAGGGTGTTTTT	979
	NA-5'(N1)	N1F1 N1R1099	AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATG CCTATCCAAACACCATTGCCGTAT	1099
	NA-3'(N1)	N1F401 NARUc	GGAATGCAGAACCTTCTTCTTGAC ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGAGTTTTTT	1073
Influenza A(H3N2)	HA-5'(H3)	H3A1F6 H3A1R1	AAGCAGGGGATAATTCTATTAACC GTCTATCATTCCCTCCCAACCATT	1127
	HA-3'(H3)	H3A1F3 HARUc	TGCATCACTCCAAATGGAAGCATT ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGGTGTTTTT	863
	NA-5'(N2)	NAFUc H3N2R1095	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT TCATTTCCATCATCRAAGGCCCA	1095
	NA-3'(N2)	N2F387 NARUc	CATGCGATCCTGACAAGTGTATC ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGAGTTTTTT	1082
Influenza A Matriz	Genoma completo	MF1 MR1027	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGA AGTAGAAAACAAGGTAGTTTTTACTC	1027
Influenza B	HA-5'	BHAF1u BHAR1341	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATTTTCT AATATC TTCGTTGTGGAGTTCATCCAT	1361
	HA-3'	BHAF458 BHAREU	AGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTA ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTT	1391
	NA-5'	BNAF1u BNAR2	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATCTTCT CA GATGGACAAATCCTCCCTTGATGC	1130
	NA-3'	BNAF2 BNAR1487	GCACTCCTAATTAGCCCTCATAGA TAAGGACAATTGTTCAAAC	1182
Influenza estacional A(H1N1)	HA-5'(H1)	THAF2 SPHAR11	GCAGGGGAAAATAAAAACAACC TATTTTGGGCACTCTCCTATTG	990
	HA-3'(H1)	H1HAF552 HARUc	TACCCAAACCTGAGCAAGTCCTAT ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGGTGTTTTT	1239
	NA-5'(N1)	H1N1F6 NASPR10	AGCAGGAGATTAATGAATCCAA CCTTCCTATCCAAACACCATT	1097
	NA-3'(N1)	N1F741 NARUc	ATAATGACCGATGGCCCGAGTAAT ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGAGTTTTTT	737

Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación RT-qPCR; WHO information for the molecular detection of influenza viruses (5th revision)

5.6.3 Secuenciación

Se realizó una secuenciación parcial del genoma viral de VI, mediante la técnica de secuenciación de Sanger, con electroforesis capilar, utilizando el 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando el kit BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems) en los segmentos de los genes correspondientes a Hemaglutinina (HA) y proteína de matriz (M), basado en el protocolo de WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza; La caracterización genética se realizó utilizando la plataforma de GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) y la herramienta BLAST para alineamiento y comparación de secuencias, para posteriormente poder realizar los análisis filogenéticos correspondientes. En las tablas 6, 7 y 8 se encuentran descritos los reactivos para la preparación del master mix, el protocolo con los ciclos, tiempos y los primers utilizados respectivamente.

Reactivo	Volumen (µL)	Volumen (µL) virus	Concentración Final
Agua (Grado molecular)	30.6	33.6	
10X Buffer	7.5	7.5	
50mM MgSO ₄	1.0	1.0	
100mM dNTPs	0.9	0.9	25mM de cada dNTP
10µmol Forward Reverse	1.5	1.5	0.3 µmol/L Concentración final
10µmol Reverse Reverse	1.5	1.5	0.3 µmol/L Concentración final
ARNSin	0.5	0.5	0.2 µM
SS II RT	1.0	1.0	
Pfx Polimerasa	0.5	0.5	
ARN	5.0	2.0	
Total	50.0	50.0	

Tabla 6. Reactivos y volúmenes utilizados para el master mix en la reacción de secuenciación

Temperatura (C°)	Tiempo (min:seg)	No. De ciclos
50	30:00	
94	10:00	
94	0:05	1
55	0:05	
68	2:00	
68	10:00	40
4	Mantener	1

Tabla 7. Protocolo de temperaturas y ciclos para la reacción de secuenciación

Nombre	Secuencia
pdmHA I F*	ATGAAGGCAATACTAGTAGTT
pdmHA I R*	GATCGGATGTATATTCTGAAAT
pdmHA II 2	AATGGAAAGAGATGC
pdmHA II E2 R	TTAAATACATATTCTACACT
HA I R S	TTTGCTGAGCTTTGGGTATG
HA I F S	GTCCTCATGCTGGAGCAAA
HA II F S	AAAAGTTGATGATGGGTTCTG
HA II R S	TCCAAAGTTCTTTCATTTTCCAA
pdmNA I F	ATGAATCCAAACCAAAGAT
pdmNA I R	TAATAATTAGGGGCATTCA
pdmNA II F	ACAGGCCTCATACAAGAT
pdmNA II R	TACTTGTCATGGTAAATG
NA II F2 S	AAGGTTTTGAGATGATTTGGGA
NA II R2 S	TTCCTACGATATCTTGCTTTATTGA

Tabla 8. Primers utilizados para reacción de secuenciación. Fuente: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza

5.7 Análisis de datos

5.7.1 Análisis estadístico

Se organizó la información para determinar características clínicas y demográficas de los pacientes con infección por VIH, posterior a la confirmación del diagnóstico por RT-PCR.

Las asociaciones fueron determinadas utilizando Chi cuadrada y prueba de Fisher.

Los análisis estadísticos se realizaron por triplicado, se determinó una distribución no paramétrica, por tal motivo las variables fueron evaluadas mediante Kruskal-Wallis para variables continuas, posteriormente un análisis post-hoc utilizando Mann-Whitney U aplicando la corrección de Bonferroni. Todas las variables con valores de $P \leq 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas, el análisis se realizó utilizando el paquete IBM SPSS Statistics versión 20 (IBM Corp.)

5.7.2 Análisis filogenético

Tomando en cuenta las muestras obtenidas en la temporada 2016-2017 que pudieron secuenciarse correctamente y posterior a la caracterización de las secuencias en GISAID se realizó la inferencia de la historia evolutiva, se diseñaron 2 árboles filogenéticos, el primero tomando en cuenta el segmento del genoma que codifica para proteína de matriz (aproximadamente 1027 nucleótidos de longitud) y el segundo tomando en cuenta el genoma correspondiente a Hemaglutinina (1778 nucleótidos aproximadamente), esto fue realizado utilizando el software MEGA 6 con un enfoque de máxima similitud, basado en el modelo de 2 parámetros de Kimura, para el árbol filogenético realizado con la secuencia de proteína de Matriz y Hasegawa-Kishino-Yano para el realizado con secuencias de Hemaglutinina. Los árboles iniciales según los hallazgos fueron obtenidos automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ y utilizando el enfoque de probabilidad compuesta máxima (MCL) por parejas de secuencias de matriz, así como para secuencias de hemaglutinina, y posteriormente seleccionando en ambos casos la topología con un valor de probabilidad logarítmico superior. Los árboles se diseñaron a escala, tomando en cuenta para la longitud de las ramas el número de sustituciones en cada sitio. El análisis involucró 443 secuencias de nucleótidos en matriz y 407 en hemaglutinina. Las posiciones de codones incluidas fueron 1era+ 2da + 3era + No codificante. Todas las posiciones que contuvieran

discrepancias y falta de datos fueron eliminadas. Hubo un total de 167 posiciones para matriz y 217 en hemaglutinina en el conjunto final de datos.

Posterior al diseño de los árboles filogenéticos y la agrupación en clados correspondientes, se estudiaron las mutaciones encontradas en las variantes y se realizó la asociación con las características clínicas presentadas por los pacientes infectados.

CAPITULO VI

RESULTADOS

6.1 Epidemiología de la infección por Virus de la Influenza temporada 2009-2014

Se obtuvieron un total de 3482 pacientes diagnosticados con infección por VI, confirmados por RT-PCR, de Octubre de 2009 a Diciembre de 2014 en el estado de Nuevo León. Este período corresponde a 5 temporadas completas de influenza y la mitad de la temporada 2014-2015.

Con la información del expediente clínico, se recolectaron los datos generales, clínicos y sintomatológicos, los antecedentes de los pacientes y el tratamiento a seguir durante todo el curso de la enfermedad y se organizó la información en una base de datos general, posteriormente se realizaron tablas para analizar dicha información.

Del total de pacientes, el 79% (2611 pacientes) cursaron con sintomatología leve, y tratamiento ambulatorio, mientras que 21% (871 pacientes) tuvieron sintomatología grave y requirieron hospitalización.

Se agrupó a la población de acuerdo a género y rango de edad (Tablas 9 y 10)

		AÑO					
		AÑO 2009	AÑO 2010	AÑO 2011	AÑO 2012	AÑO 2013	AÑO 2014
SEXO	FEMENINO	50.9%	55.9%	56.3%	52.3%	52.5%	52.1%
	MASCULINO	49.1%	44.1%	43.8%	47.7%	47.5%	47.9%

Tabla 9. Porcentaje de pacientes con infección por virus de influenza confirmados, agrupados por género y temporada.

Rango de edad	Frecuencia	Porcentaje
< 10 años	799	22.9
11-19	468	13.4
20-28	554	15.9
29-38	489	14.0
39-47	424	12.2
48-56	388	11.1
57-65	180	5.2
66-75	84	2.4
76-84	66	1.9
>85	30	0.9
Total	3482	100

Tabla 10. Frecuencia de pacientes infectados por VI en el estado de Nuevo León, agrupados por rango de edad, los pacientes corresponden a los incluidos en el estudio de Octubre de 2009 a Diciembre 2014

Del total de la población estudiada, 54% fueron mujeres, la media de edad fue de 27 años, siendo 8 meses de edad el menor y 93 el mayor. El grupo de edad más afectado fue el de 25 a 44 años de edad (31% n: 1077), seguido de 45 a 64 años (18% n: 635). Los pacientes entre 5 y 44 años comprendieron el 64% del total de la población del estudio (2,222 pacientes). Las ocupaciones prevalentes en los pacientes incluidos fueron el hogar (22% n=774), estudiantes (21% N= 735) y empleados generales (14% n=484).

En la tabla 11 agrupamos las características clínicas de los pacientes, de acuerdo con el tipo de tratamiento requerido durante el curso de la infección, la

enfermedad leve (ILI con diagnóstico confirmatorio de influenza) cursó con tratamiento ambulatorio y la enfermedad grave (ILI con infección confirmada por VI con disnea, fiebre y tos + dolor torácico o polipnea) fueron hospitalizados para su atención médica y tratamiento.

	Total	Ambulatorio n (%)	Hospitalizado n (%)	Valor de P^a
Comorbilidades				
Diabetes	276	136 (5)	140 (16)	<0.001
EPOC	61	22 (1)	39 (4)	<0.001
Asma	176	124 (5)	52 (6)	0.084
Inmunosupresión	47	21 (1)	26 (3)	<0.001
Hipertensión	230	131 (5)	99 (11)	<0.001
VIH/SIDA	18	7 (0.3)	11 (1)	0.001
Cardiopatía	63	40 (2)	23 (3)	0.017
Obesidad	280	190 (7)	90 (10)	0.001
Insuficiencia renal crónica	47	19 (1)	28 (3)	<0.001
Vacunación contra influenza	733	602 (23)	131 (15)	<0.001
Síntomas				
Fiebre	3,260	2,469 (95)	791 (91)	0.008
Tos	3,220	2,441 (93)	779 (89)	0.565
Odinofagia	1,901	1,546 (59)	355 (41)	<0.001
Disnea	1,276	719 (28)	557 (64)	<0.001
Irritabilidad	815	600 (23)	215 (25)	0.073
Diarrea	391	285 (11)	106 (12)	0.130
Dolor torácico	1,302	951 (36)	351 (40)	<0.001

Escalofríos	2,359	1,922 (74)	437 (50)	<0.001
Cefalea	2,846	2,266 (87)	580 (67)	<0.001
Mialgias	2,514	2,009 (77)	505 (58)	<0.001
Artralgias	2,361	1,859 (71)	502 (58)	<0.001
Malestar general	2,718	2,049 (78)	669 (77)	0.137
Rinorrea	2,567	2,068 (79)	499 (57)	<0.001
Polipnea	608	302 (12)	306 (35)	<0.001
Vómito	444	355 (14)	89 (10)	1.000
Dolor abdominal	686	541 (21)	145 (17)	0.086
Conjuntivitis	754	631 (24)	123 (14)	<0.001
Cianosis	148	52 (2)	96 (11)	<0.001
Inicio súbito	2,510	1,983 (76)	527 (61)	<0.001
Subtipo de Influenza				
A H3N2	929	756 (29)	173 (20)	<0.001
A H1N1 pdm09	1,797	1,263 (48)	534 (61)	<0.001
A N/S	326	240 (9)	86 (10)	0.546
B	430	352 (13)	78(9)	<0.001
Ocupación				
Empleado	484	329 (13)	155 (18)	<0.001
Estudiante	735	670 (26)	65 (7)	<0.001
Actividades en el hogar	774	551 (21)	223 (26)	<0.001

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con infección confirmada por VI durante la temporada 2009-2014 en el estado de Nuevo León, de acuerdo al tipo de tratamiento requerido. Los datos fueron analizados utilizando la evaluación de Fisher. EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, VIH, Virus de inmunodeficiencia humana, N/S, no subtipificado. El porcentaje mostrado corresponde al total de pacientes de cada tipo de tratamiento (2611 para los ambulatorios y 871 para los hospitalizados).

De acuerdo con la información señalada en la tabla 11 las comorbilidades más prevalentes en los pacientes infectados fueron Diabetes (276 pacientes) y Obesidad (280 pacientes), seguidas de Hipertensión (7% n=230) y Asma (5%

n= 176). Del total de pacientes incluidos en el estudio durante las temporadas 2009-2014, únicamente 21% reportaron haber sido vacunados contra influenza (733 pacientes).

Dentro de los síntomas principales, en ambos tipos de tratamientos, la Fiebre (n=3260) y la tos (3220) fueron los más prevalentes en 93% y 94% de los pacientes respectivamente.

El estado de Nuevo León se ubica al noreste de la república mexicana, colinda con los estados de Coahuila, Tamaulipas y San Luis Potosí y tiene también frontera norte con los Estados Unidos, el estado tiene como capital la ciudad de Monterrey. Según el censo 2015, el estado de Nuevo León tiene 5,131,93 habitantes, de los cuales el 80% de la población se concentra en el área metropolitana de Monterrey (Monterrey, Guadalupe, Apodaca, San Nicolás de los Garza, General Escobedo, Juárez, Santa Catarina, García, y San Pedro Garza García), esta podría ser una razón por la cual el mayor número de casos se presentaron en el municipio de Monterrey (30%), en la figura 6 se puede observar la distribución geográfica de la media de casos confirmados por año en el estado, durante las temporadas 2009-2014.

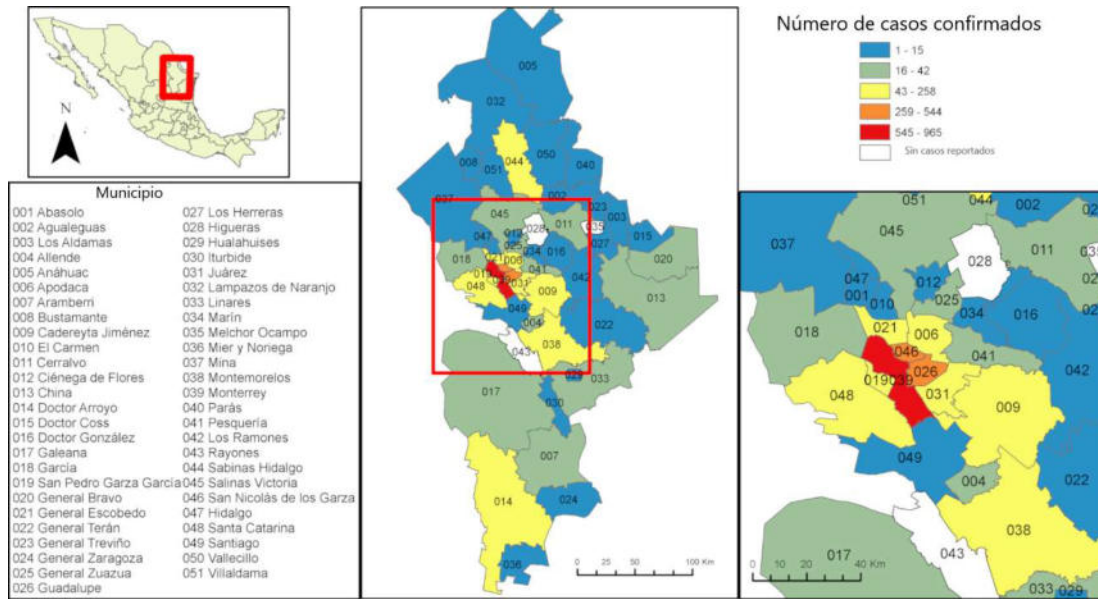


Figura 7. Distribución geográfica del promedio casos confirmados en el estado de Nuevo León por temporada durante las temporadas 2009-2014. Los nombres de cada municipio están numerados en el recuadro inferior izquierdo. El número 39 corresponde al municipio de Monterrey, la capital del estado, y donde se concentra el mayor número de casos confirmados cada temporada

El VI A H1N1 (pdm) fue el responsable del 52% (n=1,797) de los casos incluidos en este estudio durante la temporada 2009-2014, seguido por influenza A H3N2 (27% = 929 pacientes) e Influenza B (12% = 430 pacientes). Cabe mencionar que influenza A no subtipificada representó 9% (n= 326) del total de casos.

Como ya se mencionó el estudio incluyó pacientes de 5 temporadas completas de influenza y media temporada 2014-2015. La sintomatología reportada por los pacientes, así como la proporción de casos leves con tratamiento ambulatorio y enfermedad grave con requerimiento de hospitalización varió durante cada temporada analizada, como puede observarse en la tabla 12.

Síntoma	Temporada de Influenza						Valor de P ^a
	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	
Fiebre	800 (92)	631 (95)	477 (95)	410 (96)	629 (94)	247 (95)	0.015
Tos	824 (95)	629 (95)	475 (95)	408 (96)	574 (99)	246 (95)	0.009
Odinofagia	527 (61)	379 (57)	267 (54)	232 (55)	320 (56)	142 (56)	0.071
Disnea	334 (39)	213 (32)	184 (37)	129 (30)	293 (50)	96 (37)	<0.001
Irritabilidad	133 (15)	170 (26)	144 (29)	129 (30)	163 (28)	60 (23)	<0.001
Diarrea	103 (12)	72 (11)	67 (13)	49 (12)	64 (11)	22 (9)	0.451
Dolor torácico	353 (41)	225 (35)	195 (39)	150 (36)	259 (45)	99 (38)	0.003
Escalofríos	626 (73)	443 (68)	345 (69)	298 (72)	409 (71)	194 (75)	0.207
Cefalea	752 (87)	535 (82)	418 (84)	352 (84)	502 (87)	231 (90)	0.016
Mialgia	650 (76)	466 (71)	380 (77)	326 (77)	435 (76)	206 (81)	0.051
Artralgia	612 (71)	430 (66)	354 (71)	309 (73)	423 (74)	187 (73)	0.028
Malestar general	743 (86)	498 (76)	423 (85)	338 (79)	472 (81)	199 (77)	<0.001
Rinorrea	633 (75)	536 (81)	376 (75)	354 (83)	429 (74)	196 (76)	<0.001
Polipnea	173 (20)	100 (15)	89 (18)	63 (15)	133 (23)	42 (16)	0.002
Vómito	73 (15)	104 (17)	72 (16)	82 (20)	71 (15)	27 (13)	0.207
Dolor abdominal	210 (25)	120 (18)	114 (23)	89 (21)	93 (16)	44 (17)	0.001
Conjuntivitis	191 (22)	168 (26)	128 (26)	102 (24)	105 (18)	46 (18)	0.005

Cianosis	50 (6)	23 (4)	20 (4)	11 (3)	35 (6)	5 (2)	0.006
Inicio súbito	709 (82)	418 (64)	342 (68)	333 (78)	448 (77)	213 (83)	<0.001
ILI (Ambulatorio)	633(71)	543 82	429 (85)	357 (84)	392 (59)	203 (78)	<0.001
SARI (Hospitalización)	257 (29)	122 (18)	76 (15)	67 (16)	277 (41)	56 (22)	<0.001
Diabetes	64 (8)	35 (5)	32 (6)	24 (6)	78 (12)	38 (15)	<0.001
EPOC	12(1)	16 (2)	4 (0.8)	10 (2)	10 (2)	9 (4)	0.093
Asma	37 (4)	51 (8)	22 (4)	21 (5)	23 (4)	19 (7)	0.014
Inmuno supresión	14 (2)	5 (0.08)	7 (1)	2 (0.5)	13 (2)	4 (2)	0.146
Hipertensión	44 (5)	50 (8)	29 (6)	23 (6)	60 (10)	20 (8)	0.006
VIH/SIDA	7 (0.8)	3 (0.5)	3 (0.6)	0 (0)	0 (0)	5 (2)	0.007
Cardiopatía	17 (2)	10 (2)	11 (2)	2 (0.5)	14 (2)	9 (4)	0.089
Obesidad	85 (11)	41 (6)	34 (7)	24 (6)	63 (11)	27 (10)	0.001
Insuficiencia renal crónica	17 (2)	3 (0.5)	6 (1)	4 (1)	8 (1)	8 (3)	0.023
Consumo de tabaco	77 (9)	56 (9)	33 (7)	25 (6)	50 (9)	22 (9)	0.327
Vacunación	172 (19)	208 (31)	81 (16)	114 (27)	93 (14)	31 (12)	<0.001
Ocupación: Estudiante	194 (22)	148 (22)	114 (23)	129 (30)	82 (12)	60 (23)	<0.001
Ocupación: Empleado	170 (19)	54 (8)	54 (10)	31 (7)	129 (19)	35 (14)	<0.001
Ocupación: Actividades del hogar	226 (25)	156 (24)	105 (21)	69 (16)	135 (20)	64 (25)	0.003

Tabla 12. Características clínicas de pacientes positivos a influenza durante las temporadas evaluadas (2009-2014) en el estado de Nuevo León, ^aLos datos fueron analizados utilizando Chi-cuadrada. Los números fuera de los paréntesis representan el total de pacientes positivos de cada rubro y los números en el paréntesis representan los porcentajes considerando el total de pacientes por temporadas, las variables presentan casos perdidos.

Se observa que el porcentaje de pacientes hospitalizados comenzó en 35% en la temporada 2009-2010, disminuyó en las siguientes temporadas (2010-2013) a entre 6 y 13%, y posteriormente entre 2013 y 2014 se incrementó nuevamente entre 28-31%.

La proporción de comorbilidades fue analizada durante todas las temporadas incluidas en el estudio, como se observa resumido en la tabla 12. La proporción de pacientes con diabetes fue incrementándose durante las temporadas de 8 a 15%, las temporadas con mayor índice de vacunación fueron 2010-2011 y 2012-2013 (27-31%).

La sintomatología en los pacientes también fue analizada en las diferentes temporadas (2009-2014); El porcentaje de pacientes con fiebre, odinofagia, diarrea, vómito, escalofríos, cefalea, mialgias y cianosis fue variable (Tabla 12), sin embargo, fueron los síntomas predominantes durante cada temporada. Durante la temporada 2013-2014 se observó un incremento en el porcentaje de pacientes que presentaron disnea y dolor torácico.

La media de edad varió durante las 5 temporadas analizadas (2009-2014), como se ilustra en la figura 7.

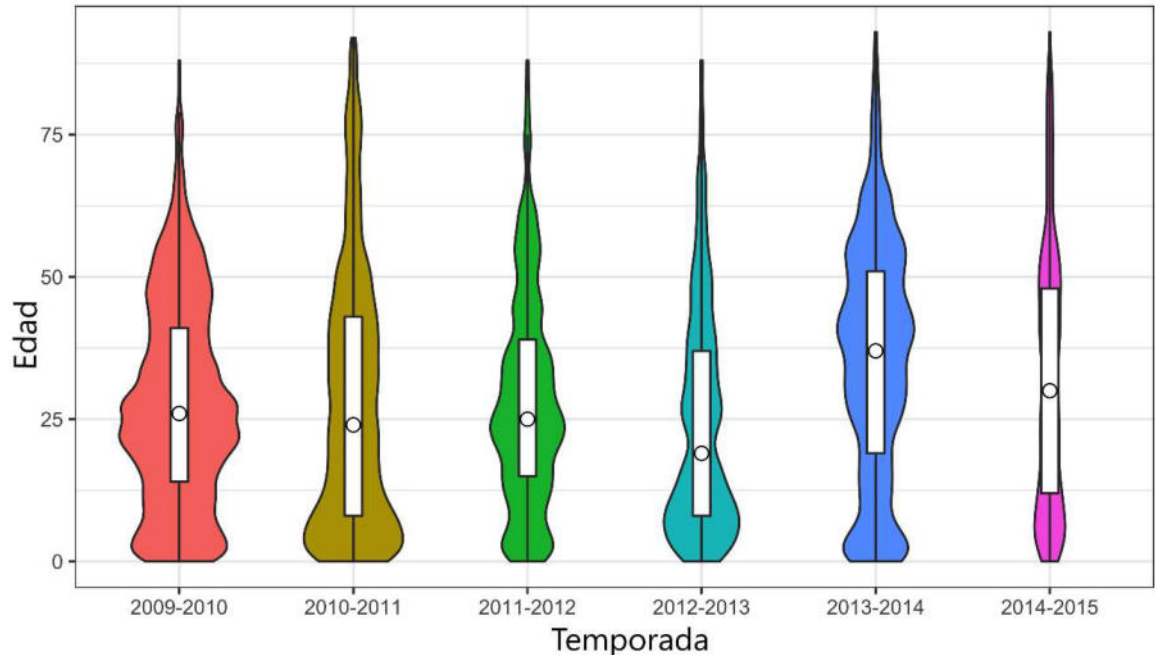


Figura 8. Distribución de edad de los pacientes infectados por temporada (2009-2014). La media corresponde al grupo de edad entre 19 y 37 años de edad. Se realizó la comparativa utilizando evaluación de Kruskal-Wallis con $P < 0.05$

La media de edad corresponde al grupo etario de adultos jóvenes (de entre 19 y 37 años). La edad promedio se mantuvo estable durante las primeras 3 temporadas (24-26 años de edad), disminuyó durante la temporada 2012-2013 a 19 años de edad, y se incrementó a 37 años de edad en la temporada 2013-2014, sin embargo, en la siguiente temporada (2014-2015) disminuyó a 30 años de edad. En la figura 7 podemos apreciar que durante las temporadas 2010-2011 y 2012-2013 los casos se concentraron en grupos etarios más jóvenes.

Considerando el número total de pacientes confirmados durante la temporada del estudio, el porcentaje más alto de pacientes corresponde a A H1N1 (51.6%)

	Subtipo de Influenza (%)				Total
	AH3N2	B	AH1N1 PDM	A N/S	
Número de pacientes	929 (26.70)	430 (12.34)	1,797 (51.60)	326 (9.36)	3,482 (100)

Tabla 13. Porcentaje de pacientes por subtipo de VI, temporadas 2009-2014

El subtipo prevalente fue muy variable entre las 6 temporadas incluidas en el estudio (Figura 8), influenza A(H1N1) pdm09 fue el subtipo principal en la temporada 2009-2010, sin embargo, se convirtió rápidamente en un virus de aparición estacional, para la temporada 2010-2011 el mayor número de casos corresponde a A H3N2; Influenza B, mostró predominancia en casos durante la temporada 2012-2013, e inclusive tuvo el mismo porcentaje de casos en 2014-2015. Actualmente la vacuna de influenza que se utiliza en México protege contra los virus A(H1N1) pdm09, A(H3N2) y tipo B.

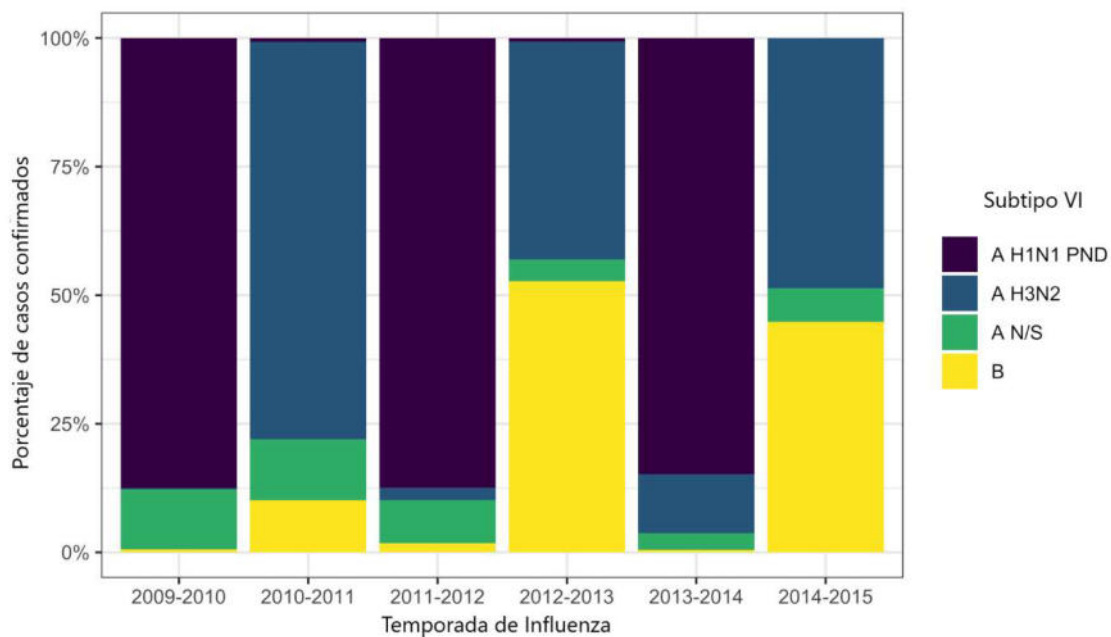


Figura 9. Porcentaje de pacientes confirmados con infección por VI, por subtipo, durante cada temporada incluida en el estudio (2009-2014)

Los subtipos prevalentes en nuestro estado están presentes en las vacunas utilizadas desde la temporada 2009-2010 hasta la fecha en nuestro país por la Secretaría de salud, en la tabla 14 se puede observar la composición de las vacunas utilizadas en México por temporada. Sin embargo, de acuerdo a los expedientes clínicos de los participantes, sólo el 21% de los pacientes incluidos en el estudio reportaron haber sido vacunados contra influenza durante la temporada de su infección.

TEMPORADA	VIRUS INCLUIDOS
2021-2022	A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) pdm09, A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2), B/Washington/02/2019 (linaje B/Victoria), B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata)
2020-2021	A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2) , B/Washington/02/2019 (linaje B/Victoria)
2019-2020	A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, A/Kansas/14/2017 (H3N2), B/Colorado/06/2017 (linaje Victoria)
2018-2019	A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-lian, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), B/Colorado/06/2017, (B/Victoria/2/87 lineage)
2017-2018	A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), B/Brisbane/60/2008
2016-2017	A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) B/Brisbane/60/2008
2015-2016	A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) B/Phuket/3073/2013
2014-2015	A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 A/Texas/50/2012 (H3N2) B/Massachusetts/2/2012
2013-2014	A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 A(H3N2) virus antigenically like the cell-propagated prototype virus A/Victoria/361/2011 B/Massachusetts/2/2012
2012-2013	A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Victoria/361/2011 (H3N2), B/Wisconsin/1/2010
2011-2012	A/California/7/2009 (H1N1) A/Perth/16/2009 (H3N2) B/Brisbane/60/2008
2010-2011	A/California/7/2009 (H1N1) A/Perth/16/2009 (H3N2) B/Brisbane/60/2008
2009-2010	A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2) B/Brisbane/60/2008-like virus

Tabla 14. Composición de las vacunas para influenza utilizadas en México por temporada.

Fuente: who /vaccinerecommendations

En cuanto al tipo de tratamiento en los infectados, el 75% del total de pacientes (2611) fue tratado ambulatoriamente, mientras que el restante 25% (871 pacientes) requirió hospitalización, la figura 8 muestra las edades promedio de los pacientes que fueron tratados ambulatoriamente contra los que requirieron hospitalización por cada temporada del estudio.

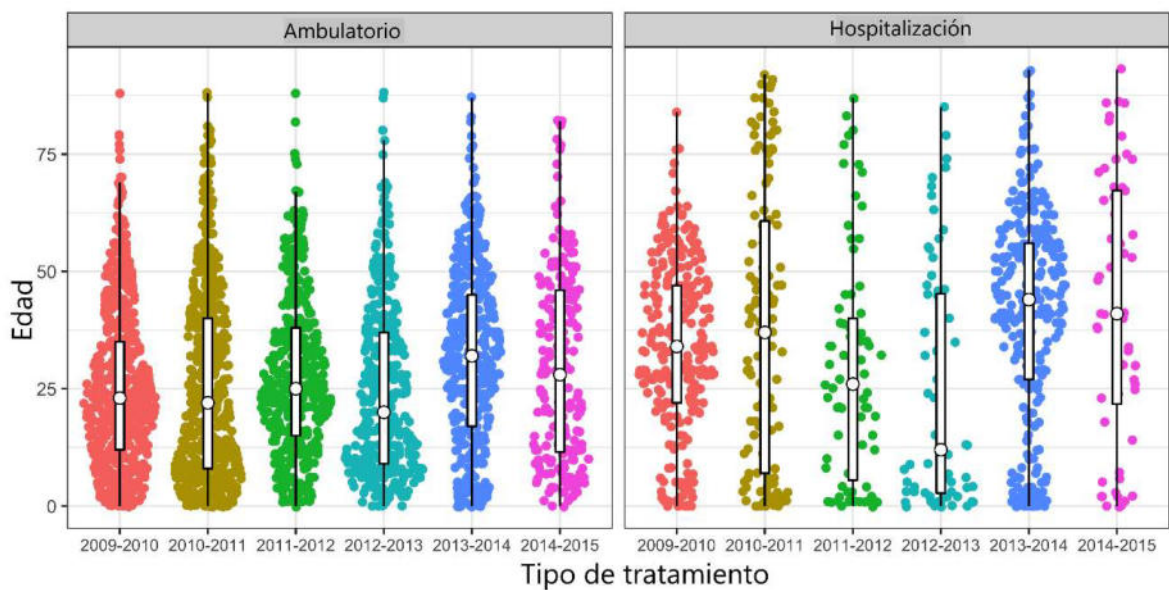


Figura 10. Comparativa de edades y tipo de tratamiento en pacientes infectados con VI durante las temporadas del estudio

El número de pacientes hospitalizados durante las diferentes temporadas de influenza fue variable; En las temporadas 2010-2011, 2011-2012, y 2012-2013 hubo el menor número de hospitalizaciones (16-18%). En contraste, la temporada 2013-2014 tuvo la máxima proporción de hospitalizaciones (41%). Las temporadas 2009-2010 y 2014-2015 tuvieron 29 y 22% de hospitalizaciones respectivamente. Observamos que el número de pacientes hospitalizados

sobrepasó el número de pacientes ambulatorios en la temporada 2013-2014.

(Figura 10)

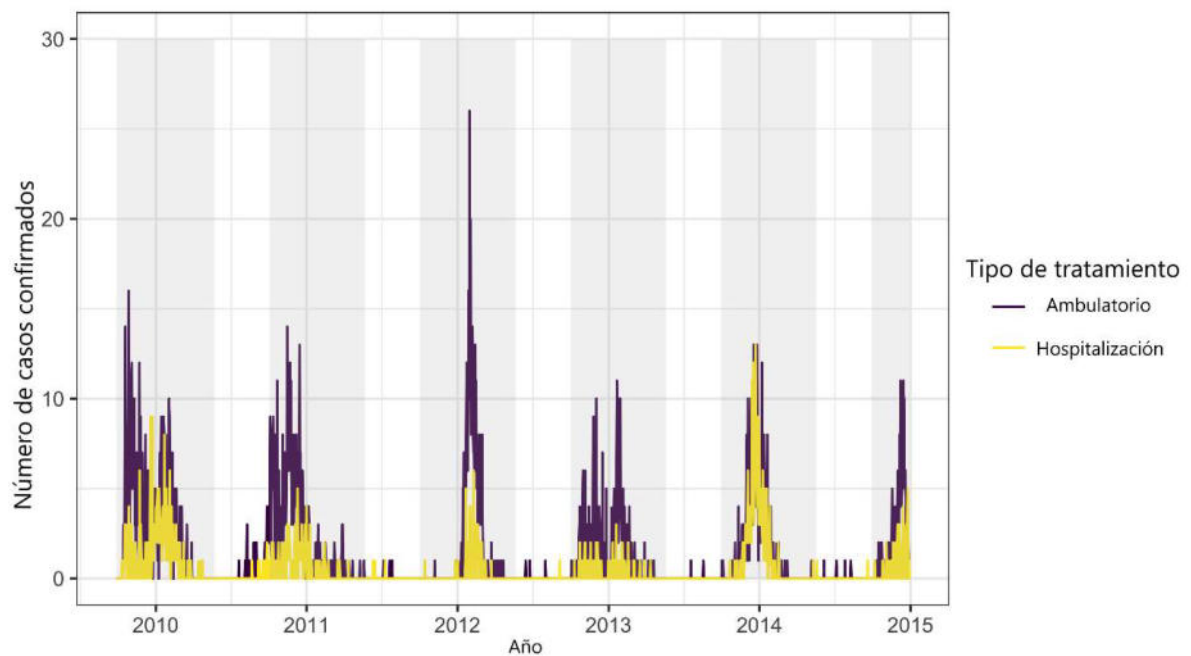


Figura 11. Número de pacientes Ambulatorios vs Hospitalizados por temporada de Influenza

La media de edad en pacientes hospitalizados fue más alta contra los pacientes ambulatorios (37 y 25 años, respectivamente, $p < 0.001$). A pesar de que el grupo de edad entre 25 – 44 años tuvo el mayor número de pacientes hospitalizados (31%), 51% de los participantes ≥ 65 años fueron hospitalizados. (Figura 8). De los pacientes hospitalizados, 50% en la temporada 2012-2013 tenían 1 año de edad o menos. La distribución de edad en los pacientes de la temporada 2013-2014 fue diferente a la observada en el resto de las temporadas, excepto 2014-2015. La mitad de los pacientes hospitalizados en la temporada 2013-2014 estuvieron en el rango de entre 27 a 56 años.

Una mayor presentación de comorbilidades se observó en los pacientes hospitalizados comparándolos con los ambulatorios. 64% de los pacientes con EPOC fueron hospitalizados, así mismo 60 y 51% de los pacientes con enfermedad renal crónica y diabetes respectivamente.

En relación con la vacunación y el riesgo de hospitalización, se encontró que 18% de los pacientes vacunados requirieron hospitalización, en contraste con el 27% de los no vacunados que requirieron hospitalización. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Con respecto a la asociación entre subtipo viral y características clínicas, del total de pacientes con influenza A H1N1 pdm09, 30% fueron hospitalizados, en contraste, del total de A H3N2 y VI B, el 19 y 18% respectivamente, fueron hospitalizados. De los pacientes con influenza A no subtipificada, 26% fueron hospitalizados. (Tabla 15)

Síntoma	Subtipo de Influenza, n (%)				Valor de P ^a
	AH3N2 N= 929	B N= 430	AH1N1 N= 1,797	A N/S N= 326	
Fiebre	889 (96)	415 (97)	1672 (94)	119 (90)	0.007
Tos	892 (96)	404 (94)	1634 (96)	118 (89)	<0.001
Odinofagia	539 (59)	236 (55)	975 (58)	59 (45)	0.022
Disnea	318 (34)	127 (30)	711 (42)	55 (41)	<0.001
Irritabilidad	258 (28)	114 (27)	368 (22)	45 (34)	<0.001
Diarrea	91 (10)	47 (11)	197 (12)	22 (17)	0.107
Dolor torácico	335 (37)	145 (34)	703 (42)	51 (39)	0.009
Escalofríos	654 (72)	290 (69)	1216 (72)	77 (58)	0.004
Cefalea	760 (83)	362 (85)	1477 (87)	95 (73)	<0.001
Mialgia	671 (74)	330 (77)	1299 (77)	81 (63)	0.001
Artralgia	634 (70)	293 (69)	1232 (73)	79 (61)	0.005
Malestar general	732 (79)	318 (74)	1432 (84)	92 (70)	<0.001
Rinorrea	771 (83)	333 (78)	1246(74)	93 (70)	<0.001
Polipnea	148 (16)	51 (12)	337 (20)	38 (29)	<0.001
Vómito	147 (17)	73 (18)	174 (14)	28 (22)	0.066
Dolor abdominal	167 (18)	81 (19)	371 (22)	18 (14)	0.024
Conjuntivitis	224 (24)	94 (22)	364 (22)	26 (20)	0.341
Cianosis	31 (3)	11 (3)	90 (5)	9 (7)	0.013
Inicio súbito	651 (71)	323 (75)	1323 (78)	79 (60)	<0.001
Vacunación	279 (30)	82 (19)	271 (15)	101 (31)	<0.001
ILI (Ambulatorio)	756 (81)	352 (82)	1263 (70)	240 (74)	<0.001
SARI (Hospitalizado)	173 (19)	78 (18)	534 (30)	86 (27)	<0.001

Tabla 15 Características clínicas de los pacientes por subtipo viral. ^aLa información fue analizada utilizando Chi-cuadrada. El porcentaje fue calculado considerando el número total de patients por temporada

Después del análisis multivariado, se encontró que los pacientes hospitalizados eran de mayor edad, presentaron entre su sintomatología principal disnea, polipnea, cianosis, tenían antecedentes de EPOC y/o diabetes, no estaban vacunados, y estaban infectados por el subtipo A H1N1pdm09.

Por cada 10 años de incremento en la edad, la probabilidad de necesitar hospitalización se incrementa 10 veces más. Las probabilidades de requerir hospitalización entre los pacientes con disnea son de 3.6 veces más comparados con los que no presentan disnea entre sus síntomas. Las

probabilidades de ser hospitalizado entre los pacientes con polipnea son 2.3 veces mayores que aquellos pacientes que no la presentan. Los pacientes con cianosis tienen 3 veces mayor riesgo de hospitalización contra pacientes que no presenten cianosis. Las probabilidades de hospitalización entre los pacientes con EPOC son 3 veces mayores que en los pacientes sin EPOC. Pacientes con diabetes e infección por virus de la influenza tienen 1.7 veces más probabilidades de ser hospitalizados que aquellos sin diabetes al momento de la infección viral. Las probabilidades de hospitalización entre los pacientes no vacunados contra los vacunados pueden ser entre 1 hasta 1.7 veces más con una confianza del 95%. Los pacientes con influenza A H1N1pdm09 son regularmente 1.7 veces más propensos a ser hospitalizados que otros subtipos virales.

6.2 Temporada 2016-2017

6.2.1 Análisis epidemiológico

Un total de 18 pacientes con infección por virus influenza A (H1N1) confirmado por RT-qPCR fueron incluidos durante la temporada 2016-2017, de los cuales 56% fueron hombres con una edad promedio de 32 años, de estos pacientes sólo 1 se reportó previamente vacunado.

La sintomatología principal y su relación con la hospitalización, así como la mortalidad en los pacientes hospitalizados se encuentran resumidas en las tablas 16 y 17 respectivamente.

	Total N=18		Ambulatorios N=13		Hospitalizados N=5	
	N	%	N	%	N	%
Fiebre	17	94.4	12	92.3	5	100
Tos	18	100	13	100	5	100
Odinofagia	13	72	8	61.5	5	100
Disnea	7	38.9	3	23.1	4	80
Dolor torácico	7	38.9	5	38.5	2	40
Cefalea	18	100	13	100	5	100
Rinorrea	15	83.3	12	92.3	3	60

Tabla 16 Sintomatología y tipo de atención en pacientes de la temporada 2016-2017

Muere	Hospitalizados		Total
	No	Sí	
No	13 (100%)	2 (40%)	15 (83.3%)
Sí	0 (0)	3 (60%)	3 (16.7%)
Total	13 (100%)	5 (100%)	18 (100%)

Tabla 17 Mortalidad en pacientes hospitalizados, 18 muestras de la temporada 2016-2017. χ^2 , P

= 0.012

6.2.2 Análisis filogenético

Se lograron secuenciar parcialmente 4 muestras A(H1N1) temporada 2016-2017 y se realizó análisis filogenético correspondiente a los genes de HA y M.

El análisis de M permitió agrupar las muestras en el mismo clado de A (H1N1) que actualmente han sido reportadas como circulantes en la región noreste de México, sin embargo, el análisis de las secuencias HA clasifican las cepas en diferentes clados. En la figura 10 se observa el árbol filogenético correspondiente al análisis de la proteína de matriz, mientras que en la figura 11 puede observarse el árbol filogenético resultado del análisis de Hemaglutinina, se puede observar los 2 diferentes clados en los cuales se agrupan los virus secuenciados en éste estudio, durante la temporada 2016-2017.

EPI ISL 248229 A/Tennessee/36/2016 2016-12-26
EPI ISL 248227 A/Texas/199/2016 2016-12-27
EPI ISL 248226 A/Hawaii/101/2016 2016-12-06
EPI ISL 248221 A/Costa Rica/1722/2016 2016-12-27
EPI ISL 248220 A/Costa Rica/1534/2016 2016-12-25
EPI ISL 248219 A/Costa Rica/1419/2016 2016-12-21
EPI ISL 244236 A/Indiana/02/2017 2017-01-02
EPI ISL 244235 A/Indiana/01/2017 2017-01-02
EPI ISL 244231 A/Connecticut/41/2016 2016-12-17
EPI ISL 244230 A/Connecticut/40/2016 2016-12-17
EPI ISL 244228 A/California/205/2016 2016-12-25
EPI ISL 242684 A/Wisconsin/105/2016 2016-12-24
EPI ISL 242683 A/Wisconsin/104/2016 2016-12-23
EPI ISL 242680 A/Indiana/02/2017 2017-01-02
EPI ISL 242679 A/Indiana/01/2017 2017-01-02
EPI ISL 242678 A/Hawaii/101/2016 2016-12-06
EPI ISL 242677 A/Hawaii/100/2016 2016-12-06
EPI ISL 242672 A/California/194/2016 2016-12-26
EPI ISL 241649 A/Iowa/39/2016 2016-12-09
EPI ISL 241648 A/Wisconsin/100/2016 2016-12-16
EPI ISL 241645 A/Wisconsin/101/2016 2016-12-18
EPI ISL 241644 A/Texas/199/2016 2016-12-27
EPI ISL 241643 A/Montana/65/2016 2016-12-06
EPI ISL 241639 A/Maryland/28/2016 2016-12-05
EPI ISL 241638 A/California/172/2016 2016-12-07
EPI ISL 241635 A/Texas/194/2016 2016-12-12
EPI ISL 240870 A/North Dakota/29/2016 2016-12-15
EPI ISL 240300 A/Wisconsin/99/2016 2016-12-07
CY213493.1 A/Texas/199/2016(H1N1)
CY213485.1 A/Wisconsin/101/2016(H1N1)
CY213477.1 A/Wisconsin/100/2016(H1N1)
CY213461.1 A/Iowa/39/2016(H1N1)
CY213453.1 A/Texas/194/2016(H1N1)
CY213445.1 A/California/172/2016(H1N1)
CY213437.1 A/California/171/2016(H1N1)
CY213429.1 A/California/170/2016(H1N1)
CY213421.1 A/Montana/63/2016(H1N1)
CY213413.1 A/Montana/65/2016(H1N1)
CY213381.1 A/Maryland/28/2016(H1N1)
CY213373.1 A/North Dakota/29/2016(H1N1)
CY213365.1 A/New Mexico/53/2016(H1N1)
CY213349.1 A/Hawaii/92/2016(H1N1)
CY213341.1 A/Nevada/42/2016(H1N1)
CY213333.1 A/California/153/2016(H1N1)
CY211149.1 A/Florida/99/2016(H1N1)

EPI ISL 249928 A/Iowa/04/2017 2017-01-18
 EPI ISL 253220 A/Texas/49/2017 2017-02-13
 EPI ISL 256098 A/Wyoming/09/2017 2017-02-24
 61 EPI ISL 257632 A/Wyoming/09/2017 2017-02-24
 CY211141.1 A/Wisconsin/99/2016(H1N1)
 62 EPI ISL 256908 A/Hawaii/10/2017 2017-02-24
 EPI ISL 257808 A/Ohio/07/2017 2017-02-10
 EPI ISL 242671 A/California/193/2016 2016-12-24
 EPI ISL 248940 A/California/193/2016 2016-12-24
 64 EPI ISL 252290 A/California/193/2016 2016-12-24
 EPI ISL 254345 A/California/193/2016 2016-12-24
 EPI ISL 258135 A/Texas/69/2017 2017-03-02
 EPI ISL 258149 A/Rhode Island/09/2017 2017-02-21
 EPI ISL 258134 A/New York/08/2017 2017-01-30
 EPI ISL 257801 A/New York/08/2017 2017-01-30
 EPI ISL 257614 A/California/30/2017 2017-01-13
 64 EPI ISL 255939 A/California/30/2017 2017-01-13
 EPI ISL 254164 A/Indiana/03/2017 2017-01-02
 EPI ISL 253219 A/Texas/43/2017 2017-02-06
 EPI ISL 253218 A/Texas/31/2017 2017-01-26
 EPI ISL 253213 A/Louisiana/06/2017 2017-01-28
 EPI ISL 249933 A/Texas/31/2017 2017-01-26
 EPI ISL 248264 A/Indiana/03/2017 2017-01-02
 EPI ISL 256094 A/New Mexico/10/2017 2017-02-23
 EPI ISL 248955 A/Oklahoma/04/2017 2017-01-09
 64 EPI ISL 254587 A/Oklahoma/04/2017 2017-01-09
 EPI ISL 248218 A/Costa Rica/0513/2016 2016-12-13
 EPI ISL 242676 A/Colorado/46/2016 2016-12-25
 EPI ISL 244239 A/Massachusetts/46/2016 2016-12-29
 EPI ISL 248225 A/Colorado/46/2016 2016-12-25
 EPI ISL 248253 A/Utah/04/2017 2017-01-18
 EPI ISL 248947 A/Massachusetts/46/2016 2016-12-29
 EPI ISL 249924 A/New Hampshire/05/2017 2017-01-31
 EPI ISL 252287 A/Colorado/46/2016 2016-12-25
 EPI ISL 252985 A/North Dakota/08/2017 2017-02-09
 EPI ISL 254148 A/Utah/04/2017 2017-01-18
 65 EPI ISL 254171 A/Massachusetts/46/2016 2016-12-29
 EPI ISL 254568 A/Massachusetts/46/2016 2016-12-29
 EPI ISL 254583 A/Colorado/46/2016 2016-12-25
 EPI ISL 255311 A/New Hampshire/05/2017 2017-01-31
 EPI ISL 256093 A/New Mexico/08/2017 2017-02-21
 EPI ISL 256913 A/North Carolina/10/2017 2017-02-05
 EPI ISL 257636 A/New Mexico/08/2017 2017-02-21
 EPI ISL 257802 A/North Carolina/10/2017 2017-02-05
 EPI ISL 257803 A/North Carolina/10/2017 2017-02-05
 CY211133.1 A/North Carolina/61/2016(H1N1)
 CY211125.1 A/Montana/60/2016(H1N1)
 CY211117.1 A/Montana/61/2016(H1N1)
 CY211109.1 A/Georgia/60/2016(H1N1)
 CY211101.1 A/Maryland/22/2016(H1N1)
 CY211085.1 A/Wisconsin/94/2016(H1N1)
 CY211077.1 A/California/159/2016(H1N1)
 CY211069.1 A/Florida/93/2016(H1N1)
 CY211061.1 A/Tennessee/31/2016(H1N1)
 CY128284.1 A/Viet Nam/13032071/2009(H1N1)
 CY107207.1 A/Scotland/Paisley 425827/2009(H1N1)
 CY089611.1 A/Nanchang/8002/2009(H1N1)
 CY067791.1 A/Lisboa/162/2009(H1N1)
 CY064477.1 A/Boston/106/2009(H1N1)
 CY061172.1 A/Texas/JMS411/2010(H1N1)
 CY052600.1 A/Texas/45033567/2009(H1N1)
 KX918815.1 A/Pennsylvania/51/2016(H1N1)

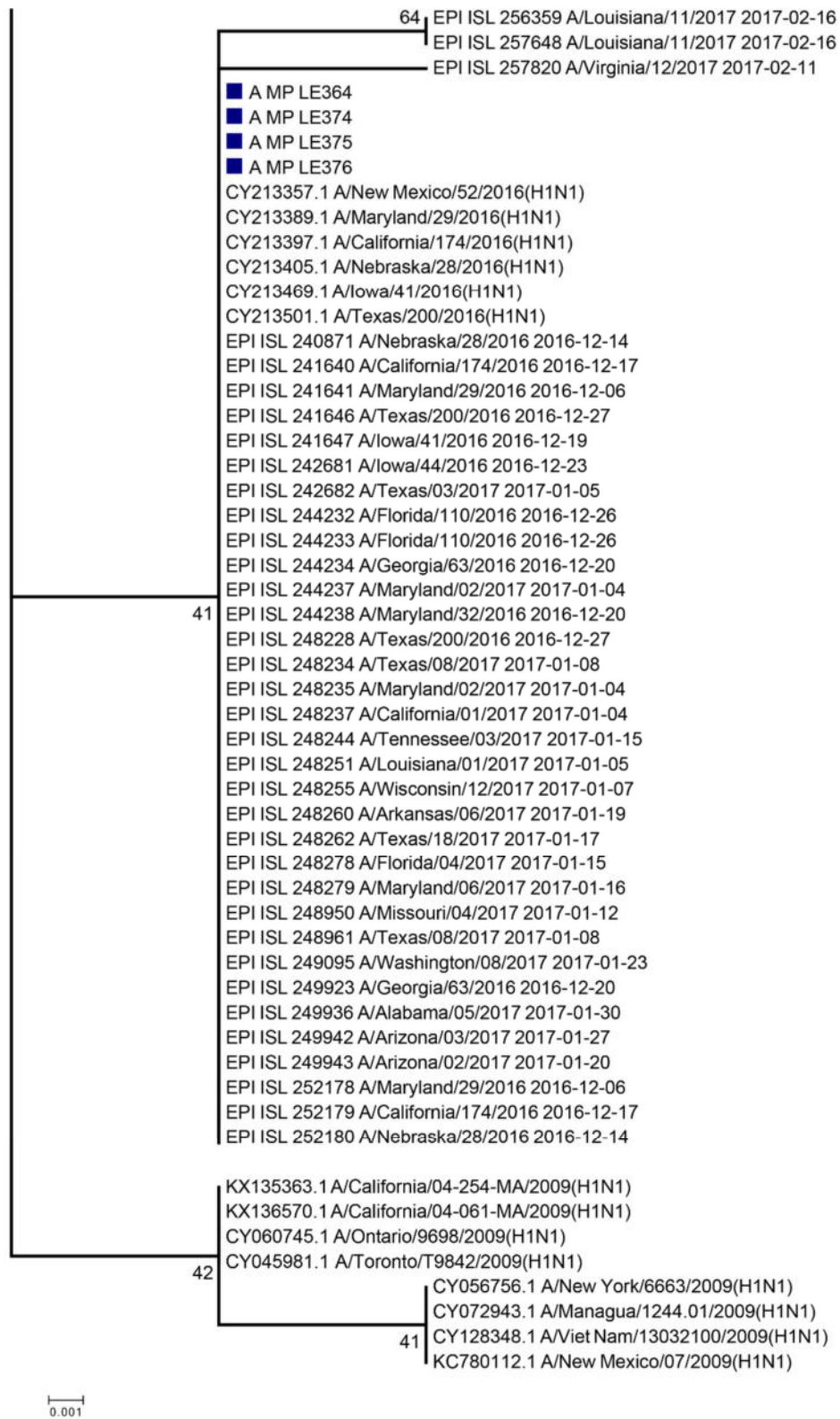
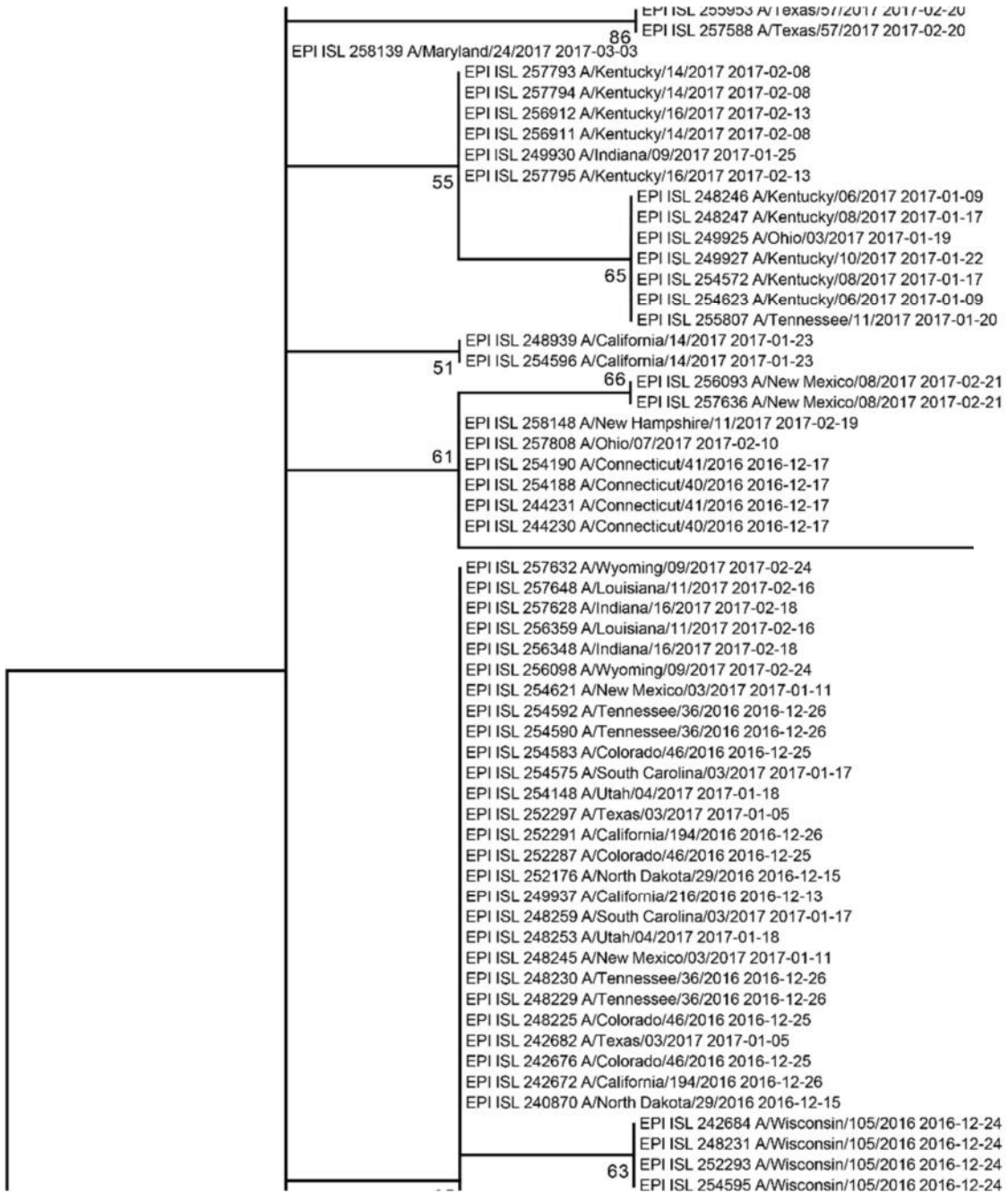


Figura 12. Análisis filogenético por método de máxima similitud. Árbol correspondiente a asociación considerando proteína de matriz. Realizado en MEGA6

	EPI ISL 249935 A/Wisconsin/21/2017 2017-01-23
	EPI ISL 249938 A/California/217/2016 2016-12-27
	EPI ISL 249934 A/Wisconsin/18/2017 2017-01-18
63	EPI ISL 254154 A/Connecticut/01/2017 2017-01-04
	EPI ISL 254168 A/Virginia/06/2017 2017-01-11
	EPI ISL 248280 A/Virginia/06/2017 2017-01-11
	EPI ISL 248257 A/Connecticut/01/2017 2017-01-04
	EPI ISL 248220 A/Costa Rica/1534/2016 2016-12-25
	EPI ISL 257806 A/North Carolina/13/2017 2017-02-09
	EPI ISL 258141 A/New York/09/2017 2017-02-08
65	EPI ISL 258146 A/New York/09/2017 2017-02-08
	EPI ISL 257787 A/California/43/2017 2017-02-10
	EPI ISL 255942 A/Florida/09/2017 2017-02-01
64	EPI ISL 257583 A/Florida/09/2017 2017-02-01
	EPI ISL 257576 A/Maryland/09/2017 2017-01-31
	EPI ISL 257634 A/Arizona/10/2017 2017-02-19
	EPI ISL 257574 A/Maryland/09/2017 2017-01-31
64	EPI ISL 256347 A/Maryland/09/2017 2017-01-31
	EPI ISL 256088 A/Arizona/10/2017 2017-02-19
	EPI ISL 255944 A/Maryland/09/2017 2017-01-31
	EPI ISL 252743 A/Hawaii/04/2017 2017-01-18
	EPI ISL 252742 A/Arizona/07/2017 2017-02-05
	EPI ISL 249926 A/Texas/34/2017 2017-02-01
	EPI ISL 253220 A/Texas/49/2017 2017-02-13
62	EPI ISL 248263 A/Indiana/04/2017 2017-01-10
	EPI ISL 254162 A/Indiana/04/2017 2017-01-10
	EPI ISL 248360 A/Wisconsin/09/2017 2017-01-17
65	EPI ISL 254413 A/Wisconsin/09/2017 2017-01-17
	EPI ISL 257812 A/South Dakota/08/2017 2017-02-05
	EPI ISL 257815 A/South Dakota/14/2017 2017-02-19
	EPI ISL 254610 A/Montana/02/2017 2017-01-09
	EPI ISL 254608 A/Montana/71/2016 2016-12-31
	EPI ISL 254585 A/Montana/04/2017 2017-01-17
64	EPI ISL 254145 A/North Dakota/01/2017 2017-01-11
	EPI ISL 252181 A/Montana/65/2016 2016-12-06
	EPI ISL 248951 A/Montana/04/2017 2017-01-17
	EPI ISL 248250 A/North Dakota/01/2017 2017-01-11
	EPI ISL 248240 A/Montana/02/2017 2017-01-09
	EPI ISL 248239 A/Montana/71/2016 2016-12-31
	EPI ISL 241643 A/Montana/65/2016 2016-12-06
	■ A HA H1 LE367 parcial
	EPI ISL 258149 A/Rhode Island/09/2017 2017-02-21
	EPI ISL 248264 A/Indiana/03/2017 2017-01-02
	EPI ISL 249933 A/Texas/31/2017 2017-01-26
	EPI ISL 253213 A/Louisiana/06/2017 2017-01-28
	EPI ISL 253218 A/Texas/31/2017 2017-01-26
	EPI ISL 253219 A/Texas/43/2017 2017-02-06
64	EPI ISL 254164 A/Indiana/03/2017 2017-01-02
	EPI ISL 255939 A/California/30/2017 2017-01-13
	EPI ISL 256094 A/New Mexico/10/2017 2017-02-23
	EPI ISL 257614 A/California/30/2017 2017-01-13
	EPI ISL 257801 A/New York/08/2017 2017-01-30
	EPI ISL 258134 A/New York/08/2017 2017-01-30
	EPI ISL 258135 A/Texas/69/2017 2017-03-02



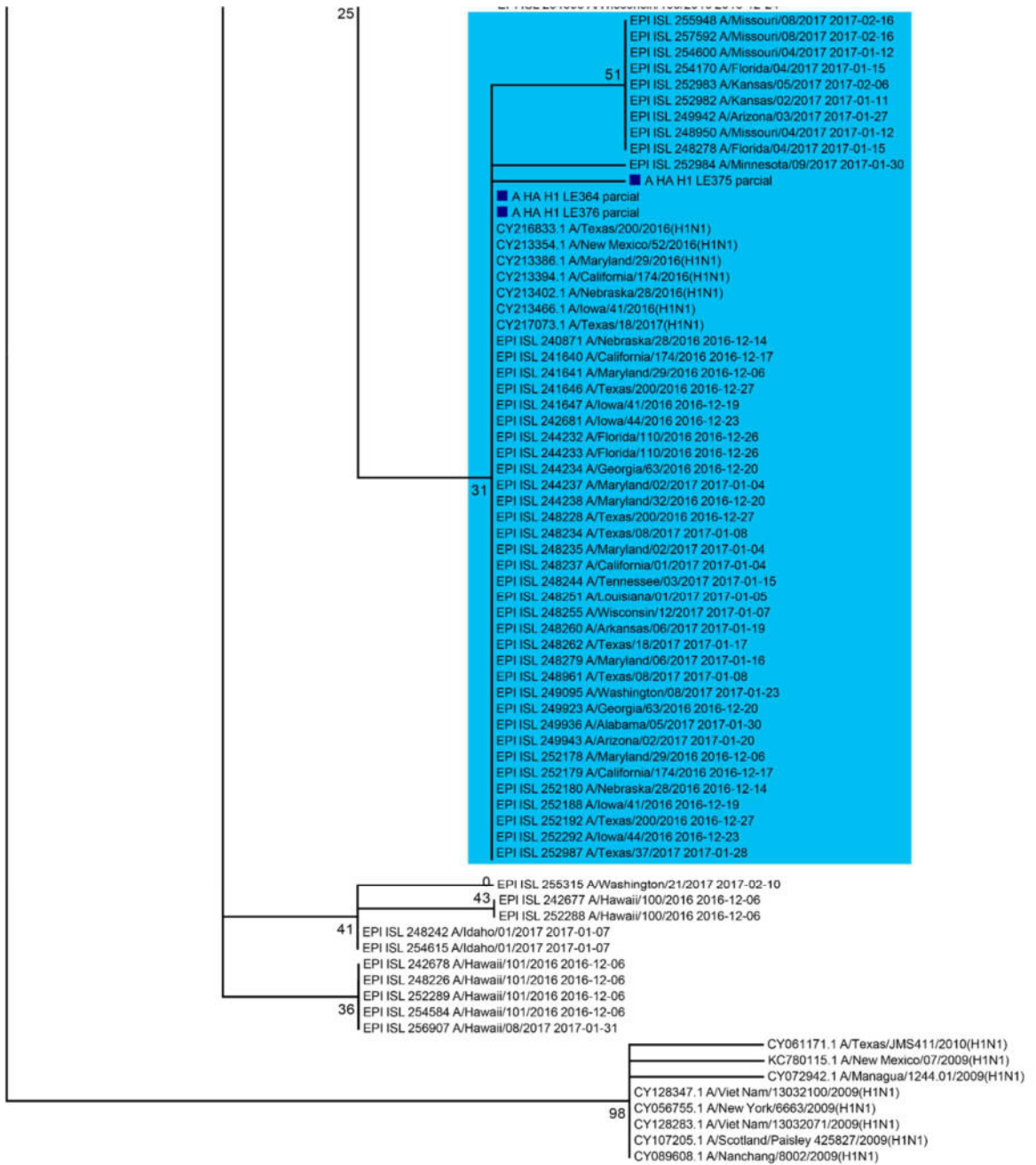


Figura 13. Análisis filogenético por método de máxima similitud. Árbol correspondiente a asociación considerando Hemaglutinina. Realizado en MEGA6

Tomando en cuenta la división en 2 clados a partir del análisis de hemaglutinina, se realizó una caracterización de síntomas, los cuales se encuentran resumidos en la siguiente tabla (Tabla 18)

	Clado A		Clado B		Total	
	n	%	n	%	n	%
Fiebre	3	100	1	100	4	100
Tos	3	100	1	100	4	100
Odinofagia	2	67	0	0	2	50
Disnea	1	34	0	0	1	25
Dolor torácico	2	67	1	100	3	75
Cefalea	3	100	1	100	4	100
Rinorrea	3	100	1	100	4	100
Irritabilidad	1	34	0	0	1	25
Inicio súbito	3	100	1	100	4	100
Diarrea	0	0	0	0	0	0
Escalofríos	2	67	1	100	3	75
Mialgias	3	100	0	0	3	75
Artralgias	3	100	0	0	3	75
Malestar general	3	100	1	100	4	100
Polipnea	0	0	0	0	0	0
Vomito	0	0	0	0	0	0
Dolor abdominal	2	67	0	0	2	50
Conjuntivas hiperémicas	0	0	0	0	0	0
Cianosis	0	0	0	0	0	0

Tabla 18. Síntomas presentados en los pacientes temporada 2016-2017, de acuerdo al clado correspondiente en base al árbol filogenético de HA

Al comparar la presentación clínica en los dos clados encontramos que los pacientes agrupados en el clado A presentaban una más amplia gama de

síntomas entre los que destacan: Odinofagia, disnea, mialgias, artralgias y dolor abdominal.

Cabe mencionar que los hallazgos encontrados tienen la limitación del bajo número de muestras analizadas.

6.2.3 Análisis de resistencia antiviral

Tomando en cuenta el hallazgo de cambios en la filogenia de los virus circulantes y la alta tasa de mutaciones presentadas históricamente en los VI, y además considerando la falta de regulación en la venta libre de fármacos antivirales en México, se decidió buscar en las partes del genoma relacionadas a NA la existencia de mutaciones que comprometan la función antiviral de los fármacos de elección para tratamiento en el país.

Se realizó la secuenciación del gen NA para buscar dichas mutaciones relacionadas a la resistencia antiviral en los virus circulantes, las cuales no se encontraron, las mutaciones responsables de la resistencia a antivirales que se buscaron en la secuencia de NA (Figura 13) fueron:

Mut E119G/D negativo = A356G (triplete **GAA>GGA**) A357C (**GAA>GAC**) A357T (**GAA>GAT**), Mut Q136K negativo = C406A (triplete **CAA>AAA**), Mut I223R negativo = T668G (triplete **ATA>AGA**), Mut H275Y negativo = C823T (triplete **CAC>TAC**).

Por esta razón se infiere que en la temporada 2016-2017 los virus circulantes en el estado continúan presentando sensibilidad a fármacos inhibidores de la neuraminidasa como el oseltamivir. De nuevo se encuentra la limitante del bajo número de muestras secuenciadas.

Neuraminidasa N1

```
CTCTCTCTGCCTGTTAGTGGATGGGCTATATACAGTAAAGACAACAGTGTAAGAAACGAGTTCCAAGG
GGGATGTGTTTGCATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCTCCATTGGAATGCAGAACCTTCTTCTTGA
CTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACC
CTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCCCTCCATACAACCTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTC
AGCAAGTGCTTGCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCAGACAGTGGGGCAG
TGGCTGTGTTAAAGTACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAATATATTGAG
AACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACCATAATGACCGATGGACCAAGTG
ATGGACAGGCCTCATACAAATCTTCAGAATAGAAAAGGAAAGATAATCAAATCAGTCGAAATGAA
AGCCCTAATTATCACTTATGAGGAATGCTCCTGTTACCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAG
GGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTCTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATGGGA
TACATATGCAGTGGGGTTTTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGT
ATCGTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGGATAGGGA
GAACTAAAAGCATTAGTTCAAGAGAAGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAATGGATGGACTGGGAC
TGACAATAAATTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAAATGAGTGGTCAGGGTATAGCGGGAGT
```

Figura 14. Secuencia correspondiente al gen de neuraminidasa (NA) donde se detallan las mutaciones buscadas para determinar la Resistencia antiviral

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

El análisis de las características de los virus de influenza que circulan en cada región geográfica durante cada temporada es de suma importancia debido a la historia de pandemias relacionadas a la infección por éste virus, las cuales se han visto favorecidas por los cambios en el genoma viral, ya que modifican la estructura y antigenicidad del virus permitiendo que, a pesar de la vacunación, la infección se presente en los pacientes. Esto toma aún mayor relevancia en esta época, ya que nos hemos visto afectados por la pandemia de COVID-19, en donde cambios menores, han dado lugar a la aparición de nuevas oleadas de casos y muertes a nivel mundial y abren la necesidad de nuevas estrategias para optimizar tanto el desarrollo de nuevas vacunas como las estrategias de salud pública para prevención, incluyendo la vacunación, así como la necesidad de caracterizar la sintomatología para favorecer el uso de algoritmos de diagnóstico diferencial y de ésta manera mejorar la toma de decisiones en el tratamiento de los pacientes.

En México, además, es muy importante tomar en cuenta estos cambios debido a la alta renuencia a la vacunación, la falta de recursos para los programas

preventivos de salud pública, además de la facilidad de transmisión por la alta densidad de población en la mayoría de los estados.

Al caracterizar la epidemiología de 5 temporadas completas de influenza (2009-2014) y la mitad de la temporada 2014-2015 y agrupar a los pacientes por sus características, observamos como la proporción de afectación a pacientes femeninas concuerda con lo reportado en estudios previos en el país como el de Ruiz-Matus ⁶⁷, es decir entre 50-56%. Comparando la media de edad en los pacientes, también observamos congruencia con lo reportado, es decir entre 27 a 37 años de edad, aquí es importante recalcar que el grupo de edad es uno de los mayores grupos económicamente activos, por lo tanto, refuerza la necesidad de seguir trabajando en estudios de éste tipo, tratando de prevenir el alto ausentismo laboral y su impacto económico, derivado de días cama o inclusive hospitalizaciones.

Con respecto a las comorbilidades, observamos entre 6 a 11% menos de lo reportado a nivel nacional por Ruiz-Matus, al agrupar los datos por temporada. Por ejemplo, en la temporada 2011-2012, el 22% de los pacientes tuvieron al menos una comorbilidad, comparado con lo reportado previamente por éste grupo de 33%. En la temporada 2013-2014 se observó un 2% de pacientes infectados con diagnóstico previo de EPOC y 14% con diabetes, contra 12 y 14% respectivamente que reportó el grupo de investigación de Albarrán-Sánchez ⁷⁰, sin embargo el reporte de éste grupo incluye pacientes de un solo hospital en Ciudad de México.

Al caracterizar los subtipos, encontramos un patrón bianual de aparición, tal como lo había reportado previamente Ruiz-Matus⁶⁷ es decir AH1N1pdm en las temporadas 2009-2010, 2011-2012 y 2013-2014 y AH3N2 en las temporadas 2010-2011, 2012-2013 y 2014-2015. Es importante mencionar que a pesar de que influenza A H3N2 estuvo presente en la temporada 2012-2013, influenza B fue responsable de 53% de las infecciones. De manera general, la proporción de subtipos de virus de influenza observadas en Nuevo León durante el período del estudio fue similar a lo reportado por Fernandes-Matano⁶⁸, es decir, predominio de AH1N1pdm, seguido por AH3N2, tipo B y No subtipificada; Al observar el mismo patrón, se demuestra que el virus afecta de manera similar a todo el país.

De los síntomas principales en los pacientes confirmados, la tos fue de los más prevalentes, tal y como lo presentó el equipo de Fernandes-Matano⁶⁸. Sin embargo, nosotros encontramos que el más prevalente fue la fiebre, contrastando con Fernandes-Matano que solo reporta fiebre en el 79% de los pacientes. Ambos síntomas son también de alta prevalencia en otras enfermedades respiratorias, tales como COVID-19, por lo tanto, es altamente recomendable comparar los porcentajes de aparición de éstos síntomas en las etapas agudas de ambas enfermedades para fortalecer evidencia en caso de algoritmos de diagnóstico diferencial.

Observamos una proporción mayor de pacientes vacunados, considerando las temporadas evaluadas, que lo reportado por Fernandes-Matano, es decir 21% contra 17%. La proporción de pacientes vacunados fue menor cuando

AH1N1pdm fue la prevalente en la temporada. Nuestros hallazgos corresponden a lo reportado por Ruiz-Matus⁶⁷. Albarrán-Sánchez⁷⁰ informó que el 25% de los pacientes evaluados en la temporada 2013-2014 estaban vacunados. Esta proporción es mayor que la nuestra (14%). Podría sugerir diferentes estrategias de vacunación en el país. Esta información podría influir en la importancia de promover programas de vacunación en nuestro estado, o bien replantear los ya existentes para favorecer la vacunación en los grupos etarios con el menor porcentaje de vacunados.

En comparación con Borja-Aburto, no encontramos un aumento de pacientes hospitalizados mayores de 60 años en la temporada 2011-2012. ⁷¹ De hecho, la mediana de edad de los pacientes hospitalizados en la temporada 2011-2012 fue de 25,5 años. Esta diferencia podría deberse a que la mayoría de los pacientes del estudio de Borja-Aburto eran de estados del centro de México, seguidos de los estados del sureste, que según las encuestas del INEGI tienen un número mayor de habitantes en el grupo de edad arriba de los 60 años contra los estados del noreste del país, como Nuevo León.

Según lo informado por Fernandes-Matano, la influenza pandémica AH1N1 provocó una mayor proporción de hospitalizaciones⁶⁸. En este estudio, el 65% de los pacientes hospitalizados estaban infectados con influenza pandémica AH1N1. En la temporada 2013-2014, tuvimos la mayor proporción de pacientes hospitalizados (41%). Esta alta proporción de hospitalizaciones también fue reportada por Albarrán-Sánchez en la Ciudad de México⁷⁰ y por Dávila-Torres en todo el país⁷³. El cincuenta por ciento de las hospitalizaciones en la

temporada 2013-2014 ocurrieron en pacientes de 27 a 56 años. Dávila-Torres informó un rango de edad similar en las hospitalizaciones en todo el país. También encontramos un aumento en la proporción de pacientes hospitalizados de 25 a 64 años en la temporada 2013-2014 en comparación con la temporada 2009-2010.

Después del análisis multivariado, no encontramos asociación entre la obesidad y los pacientes hospitalizados con infección por influenza confirmada. Braun informó hallazgos similares⁷², no encontraron asociación entre la obesidad y los resultados de la gravedad de la influenza entre los adultos hospitalizados en los Estados Unidos durante la temporada de influenza 2012-2013.

Se puede deducir que los casos de influenza se concentraron en el área metropolitana de Monterrey, la mediana de edad y las características clínicas variaron según la época del año y no necesariamente coincidieron con la epidemiología nacional. La vejez, tener disnea, polipnea, cianosis, malestar, EPOC, diabetes o no estar vacunado aumentaron el riesgo de hospitalización. Toda esta información y las diferentes estrategias de promoción de la salud dentro de los estados del país parecen influir en el comportamiento de la infección, especialmente en el número de pacientes vacunados.

El presente trabajo además de confirmar que la sintomatología sigue siendo consistente en los pacientes infectados desde hace varias temporadas y que coincide con lo reportado en otros trabajos realizados en el país, nos deja saber que el subtipo A(H1N1) que adquirió presentación estacional posterior a 2009

ha presentado variaciones a partir de la temporada 2016-2017, específicamente en la región codificante para hemaglutinina, por lo cual existe una co-circulación de diferentes subtipos de A(H1N1) en el estado de Nuevo León. Éstas variaciones podrían manifestarse como cambios en la presentación clínica de los pacientes infectados y favorecer la aparición de una nueva pandemia en las próximas temporadas; El tratamiento estandarizado en el país e incluido en las Guías de prácticas clínicas de la Secretaría de salud, con Oseltamivir, continúa siendo la mejor opción, tomando en cuenta la ausencia de mutaciones de resistencia a antivirales que encontramos en el gen de la proteína blanco de dichos tratamientos (Neuraminidasa), por lo cual es conveniente en los programas de salud pública, hacer énfasis en sólo dar el tratamiento en casos confirmados y llevarlo a cabo de manera completa, para evitar favorecer futuras mutaciones y dificultar el tratamiento para cepas resistentes.

Sin embargo, es importante mencionar que se requiere mayor información para hacer una correcta asociación clínica, debido a la limitada cantidad de muestras que pudieron ser secuenciadas en la elaboración éste estudio.

La vacuna utilizada en las campañas de salud anuales en México en el período actual, proporciona protección contra los subtipos prevalentes de virus de influenza en el país, por lo tanto campañas de promoción de salud que garanticen la aplicación de la vacuna a la mayoría de la población pudieran ser la diferencia para disminuir el número de infecciones complicadas e inclusive la cantidad de pacientes que requieran hospitalización, sin embargo debido a las mutaciones encontradas en los subtipos de virus de la influenza la vacuna

podiera no tener una efectividad del 100%, por tal motivo sería recomendable continuar éstos estudios para seguir monitorizando los cambios a través de las temporadas y tratar de incorporarlos a nuevas campañas de fomento a la vacunación, tratando de enfatizar en los grupos etarios con mayor riesgo y / o con mayor renuencia a vacunación, no solamente por el beneficio importante en cuestión de prevención en Influenza, si no como beneficio a todas las campañas de vacunación generales, ya que, como se ha hecho público con la aparición de la crisis sanitaria por COVID-19, los grupos antivacunas han crecido considerablemente, teniendo cada vez más recursos para promover su ideología mediante las redes sociales, lo cuál puede estar relacionado a las mutaciones de cambios mínimos, que llevan a la aparición de nuevos subtipos virales en diferentes virus respiratorios circulando en humanos a nivel mundial.

Durante la temporada 2020-2021 se observó un comportamiento atípico en la epidemiología de influenza, donde no se alcanzó el umbral epidémico, como lo describió Arellanos-Soto y colaboradores⁷⁸, debido a las medidas implementadas como respuesta a la pandemia por COVID-19, estas medidas preventivas se han comenzado a relajar precipitadamente a partir de finales del 2021, lo cual favorece las condiciones para una temporada de influenza severa, es decir, con aumento en el número de hospitalizaciones y muerte especialmente en la población no vacunada.

Este trabajo tuvo la limitante que la mayoría de las muestras se obtuvieron en el laboratorio de Secretaría de salud del estado correspondiente al área

metropolitana y en pacientes ya confirmados, por lo tanto sería conveniente continuar con ésta línea de investigación buscando incorporar pacientes con sintomatología aguda, pacientes en seguimiento, o en diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios; Inclusive aumentar la variabilidad de condiciones con pacientes que cuenten con seguridad social en otra institución o bien, buscar pacientes de instituciones privadas, lo sería de beneficio para sustentar la necesidad del cambio en los programas de prevención y salud pública, así como mejorar los algoritmos diagnósticos contra otras infecciones respiratorias de origen viral, y continuar el monitoreo de sensibilidad a los fármacos de uso específico para la enfermedad.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

1.- Los pacientes infectados con VI incluidos en el estudio (3482) se agruparon principalmente en los municipios correspondientes al área metropolitana de Monterrey, lo cual coincide con el área del estado con mayor densidad de población.

2.- Identificamos que después de la pandemia de Influenza A (H1N1) en 2009 éste subtipo viral adquirió una presentación estacional en el estado de Nuevo León, con características clínicas similares a A (H3N2) y B, esto no necesariamente coincide con la epidemiología nacional

3.- La edad avanzada, la presentación de síntomas de disnea, polipnea, cianosis, malestar general, la falta de vacunación, así como el tener como comorbilidad EPOC o diabetes aumentan en los pacientes el riesgo de hospitalización.

4.- Existen variaciones en las secuencias de hemaglutinina de los virus de influenza A (H1N1) circulando desde 2016 en el estado de Nuevo León, lo cual determina la presencia de dos clados virales diferentes.

5.- La co-circulación de cepas de 2 clados virales diferentes de influenza A(H1N1) demostró variabilidad clínica entre los pacientes infectados.

6.- Las variantes virales circulantes en el estado de Nuevo León están presentes en las vacunas de temporada proporcionadas por los sistemas públicos de salud para nuestra región.

7.- La vacuna trivalente utilizada en las campañas de salud anuales en México hasta la temporada 2020-2021 proporciona protección contra los subtipos prevalentes de virus de influenza en el país, sin embargo, el incorporar la vacuna tetravalente a las campañas públicas ha sido un acierto, ya que contiene ambos linajes de influenza B, los cuales se encuentran en circulación en todo el hemisferio Norte.

8.- Al no encontrar mutaciones en los genes de resistencia antiviral en el gen de NA, los inhibidores de la neuraminidasa, como el oseltamivir, siguen siendo la mejor opción de tratamiento para pacientes con infección confirmada.

CAPITULO IX

ANEXOS

A) Formato de consentimiento informado utilizado para recabar muestras y datos clínicos en el presente estudio. Aprobado por el comité de ética en investigación de la Facultad de Medicina UANL



Formato de Consentimiento Informado escrito



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio	Epidemiología Molecular del Virus de la Influenza en Nuevo León
Nombre de Investigador Principal	Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estima
Institución	Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León"
Servicio/Departamento	Bioquímica y Medicina Molecular
Teléfono de Contacto	83294000 ext 2583
Persona de Contacto	Dra. Blanca E. Álvarez Salas

Esta forma de consentimiento informado puede contener palabras que usted no entienda. Por favor pídale a su médico del estudio o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara.

Su participación en este estudio es voluntaria. Es importante que lea y entienda la siguiente explicación de los procedimientos propuestos. Este documento describe el propósito, los procedimientos, beneficios, riesgos conocidos, molestias, precauciones del estudio incluyendo la duración y la naturaleza de su participación.

También describe las terapias o tratamientos alternativos conocidos que pueden estar disponibles y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. No se pueden dar garantías respecto a los resultados del estudio de investigación.

Para ingresar al estudio, Usted como sujeto debe de firmar y fechar este documento con la presencia de dos testigos y finalmente recibirá una copia del mismo.

1.- PROPOSITO DEL ESTUDIO

Describir las características clínicas y epidemiológicas del virus de la Influenza en el estado de Nuevo León

2.- CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

El médico del estudio verificará que Usted cumpla con los siguientes requisitos antes de considerar su ingreso al estudio de investigación.



Hombres y Mujeres mayores de 18 años que deseen participar y cumplan con las siguientes características, mujeres no embarazadas, con síntomas de infección respiratoria como son Fiebre $>38^{\circ}\text{C}$, Flujo Nasal, Malestar General, Dificultad Respiratoria, Irritación Faringea.

3.- MEDICAMENTO/DISPOSITIVO DE ESTUDIO

Se realizará una prueba para determinar si está infectada con el virus de la influenza, y se solicitarán datos para llenar una encuesta y recolectar las manifestaciones clínicas

4.- PROCEDIMIENTOS

La toma de muestra consistirá en frotis de la faringe con un hisopo, el cual se transportará en un medio especial para su estudio. En caso de que no se pueda realizar el frotis de Faringe por alguna razón, la muestra puede ser obtenida de un aspirado bronquilo-alveolar siempre y cuando no represente un riesgo para el paciente.

5.- TERAPIAS ALTERNATIVAS

No aplica

6.- RIESGOS Y MOLESTIAS

La toma de la muestra se considera procedimiento sin riesgo, sin embargo el paciente puede en algunas ocasiones presentar molestias como son náuseas al momento de la toma, posteriormente irritación faringea leve, enrojecimiento momentáneo de la zona muestreada y sensación de cuerpo extraño durante unos minutos.

7.- POSIBLES BENEFICIOS

Usted puede verse beneficiado por su participación en este estudio, aunque no hay garantías de que tenga un beneficio directo por participar en este estudio.

Identificar el virus infectante específico.

8.- NUEVOS HALLAZGOS

El médico del estudio le informará a usted o a su representante legal acerca de cualquier hallazgo significativo que se desarrolle durante el transcurso de este estudio que pudiera afectar el deseo de seguir participando en este estudio. Usted tiene el derecho de conocerla y tomar la decisión si continúa o no en el estudio.

9.- RETIRO Y TERMINACIÓN

Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento. Si elige no participar o retirarse del estudio, su atención médica presente y/o futura no se verá afectada y no incurrirá en sanciones ni perderá los beneficios a los que usted tendría derecho de algún otro modo.

El médico podrá suspender su participación en el estudio, sin su consentimiento, por cualquiera de las siguientes circunstancias:

- 1.- Que el patrocinador del estudio cancele el estudio.
- 2.- Que el médico considere que es lo mejor para Usted.
- 3.- Que necesita algún procedimiento o medicamento que interfiera con esta investigación.
- 4.- Su participación se suspende para cumplir con los requisitos del estudio.
- 5.- Que no ha seguido las indicaciones del médico lo que pudiera traer como consecuencias problemas en Usted.

Se Usted decide retirarse de este estudio, deberá realizar lo siguiente:

- 1.- Notificar a su médico tratante del estudio
- 2.- Deberá de regresar todo el material que su médico le solicite.

Si su participación en el estudio se da por terminada, cualquier que sea la razón, el médico por su seguridad, continuará con seguimientos clínicos, además de podrá utilizar la información médica que se recabó antes de su terminación.

10.- COSTOS, REEMBOLSOS Y PAGOS

Los medicamentos, procedimientos y pruebas relacionadas con el estudio no tendrán ningún costo.

Sin embargo puede incurrir en gastos propios a la atención que normalmente recibiría.

No se recibirá estímulo económico alguno por la participación en el estudio, sin embargo la prueba realizada no tendrá costo para el paciente.

11.- CONFIDENCIALIDAD/EXPEDIENTE CLINICO

Si acepta participar en la investigación, el médico del estudio recabará y registrará información personal confidencial acerca de su salud y de su tratamiento. Esta información no contendrá su nombre completo ni su domicilio, pero podrá contener otra información acerca de Usted, tal como iniciales y su fecha de nacimiento. Toda esta información tiene como finalidad garantizar la

Formato_consentimiento_ver03



integridad científica de la investigación. Su nombre no será conocido fuera de la institución al menos que lo requiera nuestra Ley.

Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La solicitud será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto con la finalidad de proteger la integridad del Estudio.

La Facultad de Medicina y Hospital Universitario así como el Investigador serán los responsables de salvaguardar la información de acuerdo con las regulaciones locales. Usted tiene el derecho de solicitar por escrito al medico un resumen de su expediente clínico.

La información personal acerca de su salud y de su tratamiento del estudio podrá procesarse o transferirse a terceros en otros países para fines de investigación y de reportes de seguridad, incluyendo Agencias reguladoras (Secretaría de Salud SSA) locales así como a comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra institución.

Para los propósitos de este estudio, autoridades sanitarias como Secretaría de Salud y Comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra institución podrán inspeccionar el expediente clínico, incluso los que fueron recabados antes de su inicio de participación, los cuales pueden incluir su nombre, domicilio y otra información personal. En caso necesario estas auditorías o inspecciones podrán hacer fotocopias de parto o de todo su expediente clínico. La razón de esto es asegurar que el estudio se está llevando a cabo apropiadamente con la finalidad de salvaguardar sus derechos como pacientes en investigación.

Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones o en publicaciones.

La información recabada durante este estudio será recopilada en bases de datos del Investigador, los cuales podrán ser usados en otros estudios en el futuro. Estos datos no incluirán información médica personal confidencial. Se mantendrá el anonimato.

Al firmar este documento, Usted así como su representante autorizan el uso y revelaciones de la información acerca de su estado de salud y tratamiento identificado en esta forma de consentimiento. No perderá ninguno de sus derechos legales como sujeto de investigación. Si hay cambios en el uso de su información, su médico le informará.

12.- INTERVENCIÓN DEL MEDICO FAMILIAR

Se le informará a su médico de cabecera acerca de su participación en este estudio, enviándole la información médica pertinente si lo solicita así como cualquier información médica relevante.

Para que los médicos de la institución conozcan de su participación en el estudio, los expedientes clínicos cuentan con un identificador para que el médico de cabecera se ponga en contacto con el Investigador.

13.- COMPENSACION Y TRATAMIENTO DE LESIONES

Si se enferma o se lesiona debido a una complicación o adversidad que sea resultado directo del uso del medicamento/dispositivo o procedimiento en estudio, deberá Usted notificar a su Médico para que el proporcione los cuidados necesarios para el tratamiento de dicha complicación. El tratamiento recibido no tendrá ningún costo y será cubierto por la institución, así como la indemnización a la cual tendría derecho en caso de requerirla.

Si desea mayor información podrá contactar Lic. Antonio Zapata de la Riva al teléfono (81) 83294050 exts 2870 a 2874.

13.- DECLARACIÓN

Reconozco que me han dado la oportunidad de hacer preguntas relacionadas al estudio de investigación y que todas estas se me han respondido de manera clara y precisa.

Entiendo además si tengo preguntas relacionadas al estudio, así como en el caso de lesiones o complicaciones deberé de notificar de inmediato al Investigador con la siguiente información de contacto.

Nombre del Investigador Principal	Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Teléfono de Contacto	83294000 ext 2583
Teléfono de emergencias	83294000 ext 2584

Formato_consentimiento_ver03



Además entiendo que el Comité de Ética en Investigación cuenta con un número de emergencias para estos casos y que podré contactarlos para notificar de una complicación.

Urgencias Médicas. Comité de Ética en Investigación. Teléfono 044-8119085882

En caso de tener alguna pregunta relacionada a mis derechos como sujeto de investigación de la Facultad de Medicina podré contactar al Comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra institución al Presidente, Dr. José Gerardo Garza Leal, o al Representante legal de los sujetos de investigación al Lic. Antonio Zapata de la Riva.

Comité de Ética en Investigación y de Investigación

Av. Francisco I Madero Pta. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro, 66460 en Monterrey, Nuevo León México.
Teléfonos: 81-83294050 exts 2870 a 2874
www.investigacion-meduanal.com
email: investigacionclinica@meduanal.com

Al firmar este consentimiento reconozco que mi participación es voluntaria y que puedo negarme a participar o suspender mi participación en cualquier momento sin sanciones ni pérdidas de los beneficios a los que de otro modo tengo derechos.

Acepto además que mi información personal de mi salud puede utilizarse y transferirse para nuevos estudios de investigación clínica con la finalidad de brindar más información y así contar con nuevas opciones de tratamiento. Entiendo que mi información puede ser auditada o inspeccionada por agencias reguladoras como la Secretaría de Salud así como por la misma institución. Se me entrega una copia del consentimiento informado.

13.- FIRMAS

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma de la Sujeto</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>
_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma del Primer Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>





Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección

Fecha

Firma del Segundo Testigo

Nombre en letra de molde

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección

II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona, a mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

Fecha

Firma de la Persona que Otorga el
Consentimiento (Investigador Principal)

Nombre en letra de molde

CAPITULO X

BIBLIOGRAFÍA

1. Valero N, Larreal Y, Arocha F, Gotera J, Mavarez A, Bermudez J, Moran M, Maldonado M, Marina Espina L.. (2009). Viral etiology of acute respiratory infections. *Investigacion Clinica*, 50(3), 359-368
2. DGE . (2009). Anuarios de Morbilidad. Junio 4 2009, de Dirección General de Epidemiología Sitio web: <http://www.dgepi.com.mx>
3. Shanta M. Zimmer, M.D., and Donald S. Burke, M.D.. (Julio 16, 2009). Historical Perspective — Emergence of Influenza A (H1N1) Viruses. *New England Journal of Medicine*, 361, 279-285.
4. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, Ramirez-Venegas A, Rojas-Serrano J, Ormsby CE, Corrales A, Higuera A, Mondragon E, Cordova-Villalobos JA. (Aug 13, 2009). Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *New England Journal of Medicine*, 361, 680-689.

5. WHO. (2013). Estadísticas Sanitarias Mundiales. 2009-2013, de World Health Organization Sitio web: <http://who.int>
6. WHO. (2013). Flu Net. 2009-2013, de World Health Organization Sitio web: <http://flu.gov>
7. Dirección General de Epidemiología. (2013). Informes Semanales de Vigilancia Epidemiológica. 2009-2013, de Secretaría de Salud México Sitio web: <http://www.dgepi.com.mx/SINAVE>
8. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. (2009). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Influenza. Agosto 2013, de Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, México Sitio web: http://gobmx/salud/documentos/manuales/12_Manual_VE_Influenza.pdf
9. Ramos-Jiménez, J.. (2012). Virus de la Influenza. En *Infectología Clínica*(351-362). México: Manual Moderno.
10. Saldías P, Fernando. Recomendaciones para el diagnóstico, manejo y prevención de la influenza en Chile: Período 2013. *Rev. chil. enferm. respir.* [online]. 2013, vol.29, pp. 31-38
11. Harper SA, Bradley JS, Englund JA, et al. Seasonal influenza in adults and children—diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:1003–32
12. Arturo Galindo-Fraga, Ana A. Ortiz-Hernández et al (2013) Clinical characteristics and outcomes of influenza and other influenza-like

illnesses in Mexico City. *International Journal of Infectious Diseases* 17:7, pp.510-517

13. Guías de Práctica clínica para diagnóstico y tratamiento de Influenza, CENETEC; 2013
14. Information for molecular diagnosis of influenza virus in humans, *WHO*, Nov2012
15. Salathé M, Freifeld CC, Mearu SR, Tomasulo AF, Brownstein JS.. (Aug 1, 2013). Influenza A (H7N9) and the Importance of Digital Epidemiology. *New England Journal of Medicine*, 369, 401-404
16. Latorre-Margalef N, Grosbois V, Wahlgren J, Munster VJ, Tolf C, et al. (2013) Heterosubtypic Immunity to Influenza A Virus Infections in Mallards May Explain Existence of Multiple Virus Subtypes. *PLoS Pathog* 9(6): e1003443.(2013) doi:10.1371/journal.ppat.1003443
17. Robert A. Lamb "Deadly H7N9 Influenza Virus: A Pandemic in the Making or a Warning Lesson?" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 188, No. 1 (2013), pp. 1-2.
18. Carrada BT. Influenza: Avances recientes en virología molecular y prevención de la enfermedad. Junio, 2010. *Rev Mex Patol Clin*, Vol. 57, Núm. 2, pp 59-93
19. Gamblin SJ, Skehel JJ (2010) Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 285: 28403–28409
20. Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, et al. (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4269–4274

21. Galloway SE, Reed ML, Russell CJ, Steinhauer DA (2013) Influenza HA Subtypes Demonstrate Divergent Phenotypes for Cleavage Activation and pH of Fusion: Implications for Host Range and Adaptation. PLoS Pathog 9(2): e1003151.
22. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Informe semanal de vigilancia de influenza preparado por la División de Influenza (FluView) <http://www.cdc.gov/flu>
23. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Vacuna contra influenza estacional y seguridad: para médicos. <http://www.cdc.gov/flu>
24. Fiore T, Uyeki T, Broder K et al. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. 2010. MMWR Recomm Rep. 2010;59:1-66.
25. CDC. (2014). Antiviral agents for influenza: Background information for clinicians. 2014, de Centers of Disease Control Sitio web: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/antiviralback.htm>
26. Cox NJ, Subbarao K.. (1999). Influenza. Lancet, 354, 1277-82.
27. Osterholm MT. (1999). Preparing for the next pandemic. New England Journal of Medicine, 352, 1839-41.
28. Forsberg-White L, Pagano M. . (2008). Transmissibility of the influenza virus in the 1918 pandemic.. Public Library of Science, 1, e1498.
29. Kilbourne ED. . (2004). Influenza pandemics: can we prepare for the unpredictable? . Viral Immunology, 17, 350-357.

30. Kuri-Morales P, Galván F, Cravioto P, Zárraga-Rosas LA, Tapia-Conyer R. (2006). Mortalidad en México por influenza y neumonía (1990-2005). . *Salud Publica Mexico*, 48, 379-384.
31. MorbiMortality Weekly Report. (2009). Swine influenza A (H1N1) infection in two children-Southern California, March-April 2009. 2009, de Centers of Disease Control Sitio web: www.cdc.gov
32. Rothberg RB, Haessler SD, Brown RB. (2008). Complications of viral influenza. *American Journal of Medicine*, 121, 258-264.
33. ACIP. (2008-2009). Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunizations Practices. 2009, de CDC Sitio web: <http://www.cdc.gov>
34. Hayden FG. (2006). Antivirals for influenza: Historical perspectives and lessons learned.. *Antiviral Research*, 71, 372-378.
35. Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, Maeda T, Kanazawa H, Kawashima T, et al. . (2008). A comparison of the effectiveness of zanamivir and oseltamivir for the treatment of influenza A and B.. *Journal of Infectology*, 56, 51-57.
36. G.S. Freidl, A. Meijer, E. de Bruin, M. de Nardi, O. Munoz, I. Capua, et al. Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1) *Euro Surveill.*, 19 (18) (2014)
37. G.J. Smith, J. Bahl, D. Vijaykrishna, J. Zhang, L.L. Poon, H. Chen, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106 (July (28)) (2009), pp. 11709-11712

38. D. Hoper, B. Hoffmann, M. Beer. A comprehensive deep sequencing strategy for full-length genomes of influenza A. *PLoS One*, 6 (4) (2011), p. e19075
39. Greninger AL, Chen EC, Sittler T, Scheinerman A, Roubinian N, et al. (2010) A Metagenomic Analysis of Pandemic Influenza A (2009 H1N1) Infection in Patients from North America. *PLOS ONE* 5(10)
40. E. Hoffmann, J. Stech, Y. Guan, R.G. Webster, D.R. Perez. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.*, 146 (December (12)) (2001), pp. 2275-2289
41. Chi-Ho Chan a, Keh-Liang Lin, You Chan, Ya-Li Wang, Yu-Tsai Chi, Hsiao-Li Tu, Happy-K Shieh, Wu-Tse Liu. (Sept, 2006). Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 136, 38-43.
42. Kathleen A. Stellrecht, The Drift in Molecular Testing for Influenza: Mutations Affecting Assay Performance, *J. Clin. Microbiol.* March 2018 56:38
43. Yang, J.-R., Kuo, C.-Y., Huang, H.-Y., Wu, F.-T., Huang, Y.-L., Cheng, C.-Y., Liu, M.-T. (2014). Newly Emerging Mutations in the Matrix Genes of the Human Influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) Viruses Reduce the Detection Sensitivity of Real-Time Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 76–82.
44. Lam, W. , Leung, T. , Lee, N. , Cheung, J. L., Yeung, A. C., Ho, Y. I., Chan, R. C., Fung, K. S., Barr, I. G., Hui, D. S., Sung, J. J. and Chan, P.

- K. (2010), Development and comparison of molecular assays for the rapid detection of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. *J. Med. Virol.*, 82: 675-683.
45. Klaudia Chrzastek, Dong-hun Lee, Diane Smith, Poonam Sharma, L. Suarez, Mary Pantin-Jackwood, Darrell R. Kapczynski, Use of Sequence-Independent, Single-Primer-Amplification (SISPA) for rapid detection, identification, and characterization of avian RNA viruses, *Virology*, September 2017, 509, pp159-166
46. Gentile A, Lucion MF, del Valle Juarez M, Martinez AC, Romanin V, et al. (2018) Influenza virus: 16 years' experience of clinical epidemiologic patterns and associated infection factors in hospitalized children in Argentina. *PLOS ONE* 13(3): e0195135.
47. Petrie, J.G.; Gordon, A. Epidemiological Studies to Support the Development of Next Generation Influenza Vaccines. *Vaccines* 2018, 6, 17.
48. Sotomayor, V., Fasce, R. A., Vergara, N., De la Fuente, F., Loayza, S., & Palekar, R. (2018). Estimating the burden of influenza-associated hospitalizations and deaths in Chile during 2012-2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 12(1), 138–145
49. Barnes, S. R., Wansaula, Z., Herrick, K., Oren, E., Ernst, K., Olsen, S. J., & Casal, M. G. (2018). Mortality estimates among adult patients with severe acute respiratory infections from two sentinel hospitals in southern Arizona, United States, 2010–2014. *BMC Infectious Diseases*, 18, 78.

50. Sanou, A. M., Wandaogo, S. C., Poda, A. , Tamini, L. , Kyere, A. E., Sagna, T. , Ouedraogo, M. S., Pauly, M. , Hübschen, J. M., Muller, C. P., Tarnagda, Z. and Snoeck, C. J. (2018), Epidemiology and molecular characterization of influenza viruses in Burkina Faso, sub-Saharan Africa. *Influenza Other Respi Viruses*. Accepted Author Manuscript
51. S.R. Fereidouni, E. Starick, C. Grund, A. Globig, T.C. Mettenleiter, M. Beer, T. Harder, Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses, *Veterinary Microbiology*, 2009, 135(3–4), pp 253-260
52. Yogesh Chander, Naresh Jindal, David E. Stallknecht, Srinand Sreevatsan, Sagar M. Goyal, Full length sequencing of all nine subtypes of the neuraminidase gene of influenza A viruses using subtype specific primer sets, *Journal of Virological Methods*, 2010, 165(1), pp 116-120
53. Naresh Jindal, Yogesh Chander, Martha de Abin, Srinand Sreevatsan, David Stallknecht, David A. Halvorson, Sagar M. Goyal, Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method, *Journal of Virological Methods*, 2009, 160(1–2) pp 163-166
54. Yi-Mo Deng, Natalie Spirason, Pina Iannello, Lauren Jelley, Hilda Lau, Ian G. Barr, A simplified Sanger sequencing method for full genome sequencing of multiple subtypes of human influenza A viruses, *Journal of Clinical Virology*, 2015, 68, pp 43-48
55. Rasha Ali, Ruth Marion Blackburn, Zisis Kozlakidis, Next-Generation Sequencing and Influenza Virus: A Short Review of the Published

Implementation Attempts, HAYATI Journal of Biosciences, 2016, 23(4)
pp155-159

56. Wiriya Rutvisuttinunt, Piyawan Chinnawirotpisan, Sriluck Simasathien, Sanjaya K. Shrestha, In-Kyu Yoon, Chonticha Klungthong, Stefan Fernandez, Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform, Journal of Virological Methods, 2013, 193(2), pp 394-404
57. W. Rutvisuttinunt, P. Chinnawirotpisan, B. Thaisomboonsuk, P. Rodpradit, C. Ajariyakhajorn, W. Manasatienkij, S. Simasathien, S.K. Shrestha, I.K. Yoon, C. Klungthong, S. Fernandez, Viral subpopulation diversity in influenza virus isolates compared to clinical specimens, Journal of Clinical Virology, 2015, 68, pp 16-23
58. Preston Leung, Auda A. Eltahla, Andrew R. Lloyd, Rowena A. Bull, Fabio Luciani, Understanding the complex evolution of rapidly mutating viruses with deep sequencing: Beyond the analysis of viral diversity, Virus Research, 2017, 239, pp 43-54
59. Susana Posada-Céspedes, David Seifert, Niko Beerenwinkel, Recent advances in inferring viral diversity from high-throughput sequencing data, Virus Research, 2017, 239, pp 17-32
60. Flannery, B., Zimmerman, R. K., Gubareva, L. V., Garten, R. J., Chung, J. R., Nowalk, M. P., Fry, A. M. (2016). Enhanced genetic characterization of influenza A(H3N2) viruses and vaccine effectiveness by genetic group, 2014–2015. The Journal of Infectious Diseases, 214(7), 1010–1019.

61. Gaglani, M., Pruszynski, J., Murthy, K., Clipper, L., Robertson, A., Reis, M. Flannery, B. (2016). Influenza Vaccine Effectiveness Against 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Differed by Vaccine Type During 2013–2014 in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(10), 1546–1556.
62. Zimmerman, R. K., Nowalk, M. P., Chung, J., Jackson, M. L., Jackson, L. A., Petrie, J. G., Flannery, B. (2016). 2014–2015 Influenza Vaccine Effectiveness in the United States by Vaccine Type. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(12), 1564–1573.
63. Grech, V., & Borg, M. (2020). Influenza vaccination in the COVID-19 era. *Early human development*, 148, 105116.
64. Singer B. D. (2020). COVID-19 and the next influenza season. *Science advances*, 6(31), eabd0086.
65. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. Vol. 16, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 47–60.
66. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Prim*. 2018 Dec 1;4(1):1–21.
67. Ruiz-Matus C, Kuri-Morales P, Narro-Robles J. Behavior of influenza seasons in Mexico from 2010 to 2016: Analysis and prospective. *Gac Med Mex*. 2017;153(2):189–96.
68. Fernandes-Matano L, Monroy-Muñoz IE, de León MB, Leal-Herrera YA, Palomec-Nava ID, Ruíz-Pacheco JA, et al. Analysis of influenza data

generated by four epidemiological surveillance laboratories in Mexico, 2010–2016. *Epidemiol Infect.* 2019;147:1–10.

69. Mata-Marín LA, Mata-Marín JA, Vásquez-Mota VC, Arroyo-Anduiza CI, Gaytán-Martínez JE, Manjarrez-Téllez B, et al. Risk factors associated with mortality in patients infected with influenza A/H1N1 in Mexico. *BMC Res Notes.* 2015 Sep 11;8(1):432.
70. Albarrán-Sánchez A, Ramírez-Rentería C, Huerta-Montiel F, Martínez-Jerónimo A, Herrera-Landero A, García-Álvarez JL, et al. [Clinical features of patients with influenza-like illness who went to a third level center in the winter of 2013-2014]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2016;54 Suppl 2:S162-7.
71. Borja-Aburto VH, Chowell G, Viboud C, Simonsen L, Miller MA, Grajales-Muñiz C, et al. Epidemiological Characterization of a Fourth Wave of Pandemic A/H1N1 Influenza in Mexico, Winter 2011-2012: Age Shift and Severity. *Arch Med Res.* 2012 Oct;43(7):563–70.
72. Braun ES, Crawford FW, Desai MM, Meek J, Kirley PD, Miller L, et al. Obesity not associated with severity among hospitalized adults with seasonal influenza virus infection. *Infection.* 2015 Oct 30;43(5):569–75.
73. Dávila-Torres J, Chowell G, Borja-Aburto VH, Viboud C, Grajales-Muñiz C, Miller MA. Intense seasonal A/H1N1 influenza in Mexico, winter 2013-2014. *Arch Med Res.* 2015 Jan;46(1):63–70.
74. Dominguez-Cherit G, De La Torre A, Rishu A, Pinto R, Ñamendys-Silva SA, Camacho-Ortiz A, et al. Influenza A (H1N1pdm09)-Related Critical

Illness and Mortality in Mexico and Canada, 2014. Crit Care Med. 2016 Oct 1;44(10):1861–70.

75. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), <http://www.cdc.gov/flu/spotlights/pandemic-global-estimates.htm>
76. Ayllón Valdés, Lucía, Valdivia Romero, Ángel, Mas García, Martha, Trespacios Brey, Lucrecia, & Cordero López, Girelda. (2006). Algunos aspectos básicos de evolución de virus ARN: importancia médica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25
77. Alvarez-Salas, B.E., Galán-Huerta, K.A., Padilla-Rivas, G.R., Ramos-Jiménez, J., Treviño-Garza, C., Montes-De-Oca-Luna, R. ... Rivas-Estilla, A.M. (2021). Epidemiological characterization of influenza in Northern Mexico. *World Academy of Sciences Journal*, 3, 63.
78. Arellanos-Soto, D., Padilla-Rivas, G., Ramos-Jimenez, J., Galan-Huerta, K., Lozano-Sepulveda, S., Martinez-Acuña, N., Treviño-Garza, C., Montes-de-Oca-Luna, R., de-la-O-Cavazos, M., & Rivas-Estilla, A. M. (2021). Decline in influenza cases in Mexico after the implementation of public health measures for COVID-19. *Scientific reports*, 11(1), 10730.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Blanca Esthela Alvarez Salas, nacida en Monterrey Nuevo León el 28 de Abril de 1988, primera hija de Alejandro Alvarez López y Blanca Esthela Salas Leal.

Cursé la educación superior en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la carrera de Médico, cirujano y partero, de 2006 a 2012, realicé mi internado en el Hospital Universitario José Eleuterio González y el servicio social en el año 2012 en el centro de salud rural Los Ramírez, en la ciudad de León, Guanajuato. Durante el servicio social tuve la distinción de pasante destacado del servicio social además de una mención de la secretaría de salud nacional por prevenir muerte materna.

Posteriormente ingresé a trabajar a mi alma mater en el departamento de Bioquímica y medicina molecular, en el año 2013, como profesor, a cargo de la Dra. C. Herminia Martínez Rodríguez, quien me dio la oportunidad de ingresar al posgrado en el programa de Doctorado en Medicina.

En Octubre de 2014 tuve una estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Madrid, en Madrid, España, donde tuve la oportunidad de trabajar en el departamento de Microbiología, en el Laboratorio de Virología con la Dra. Susana Guerra.

Posteriormente en Enero de 2017, ya con la Dra. C Ana María G. Rivas Estilla en la jefatura del departamento, tuve la oportunidad de trabajar en colaboración con Baylor's College of Medicina, en la ciudad de Houston, Texas, con el Dr. Pedro Piedra, en el área de virología de enfermedades respiratorias.

Actualmente me encuentro casada desde 2015 con Raúl Gordiano Martínez, tengo dos hijos, Raúl y Mariana, soy profesor de tiempo completo del departamento de Bioquímica y medicina molecular de la facultad de medicina UANL, cuento con múltiples cursos para docencia y tutorías, trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales de investigación, he participado en la elaboración del manual de prácticas del departamento para la carrera de MCP y en la revisión de la 8va edición del libro Bioquímica de Abali, así como en múltiples ponencias en diversos temas de salud, he participado en el programa de mujeres en la ciencia y en el comité de revisión de Expociencias Nacional.

Se publicó el mes de Octubre de 2021 el artículo realizado a partir de mi trabajo de tesis, titulado *Epidemiological characterization of influenza in Northern Mexico* en la revista World academy of science journal.

*La suerte no es hierba que crece en el campo, llega si la buscas, se da
trabajando....*

VF