

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**SECUENCIACIÓN GENÓMICA DE AISLADOS DE VIRUS DE  
INFLUENZA A EN LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY:  
ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y SU RELACIÓN CON LA  
RESISTENCIA A LOS ANTIVIRALES**

POR

**Q.F.B. JUAN DANIEL HERNÁNDEZ ALTAMIRANO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E  
INGENIERÍA GENÉTICA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. C. KAME ALBERTO GALÁN HUERTA**

**SECUENCIACIÓN GENÓMICA DE AISLADOS DE VIRUS DE INFLUENZA A  
EN LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY: ANÁLISIS  
FILOGENÉTICO Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LOS  
ANTIVIRALES**

Aprobación de la tesis



---

**Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**

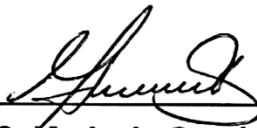
Director de tesis



---

**Dr. C. Daniel Arellanos Soto**

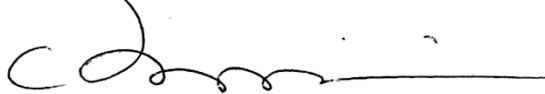
Co director de tesis



---

**Dra. C. Marisela García Hernández**

Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

Subdirector de Estudios de Posgrado

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación e Innovación en Virología Medica (CIIViM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la asesoría del Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta.

## **COLABORACIONES**

**MCP. Alí Fernando Ruiz Higareda**

**Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla**

Centro de Investigación e Innovación en Virología Medica

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Facultad de Medicina

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Dra. C. Paola Bocanegra Ibarias**

**Dr. Med. Adrián Camacho Ortiz**

Servicio de Infectología

Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías** por el apoyo económico (**1232142**) para la realización de mis estudios de maestría, así como a las distintas dependencias de la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, por permitirme el uso de sus instalaciones y por la invaluable ayuda de su personal administrativo (**Deyanira, Juany y Violeta**).

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, el **Dr. Kame Galán Huerta** por su guía, paciencia y apoyo continuo a lo largo de este proceso, incluso a la distancia. Sus conocimientos, consejos y palabras de aliento fueron fundamentales para mi desarrollo profesional, académico y personal.

A los miembros de mi comité de tesis, al **Dr. Daniel Arellanos Soto** y a la **Dra. Maricela García Hernández**, por sus valiosas sugerencias y comentarios que enriquecieron significativamente tanto mi trabajo académico como mis presentaciones en seminarios.

Al equipo de trabajo del **Servicio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”**, por proporcionarme las muestras biológicas indispensables para la realización de este trabajo de investigación.

Al equipo del **Centro de Investigación e Innovación en Virología Medica**, a las Dras., **Ana María Rivas Estilla, Sonia Lozano y Blanca Álvarez**, y los estudiantes de doctorado **Tania Heredia, Verónica Martínez y Martin García** por su disposición y comentarios para la mejora de mis seminarios y trabajo experimental. Además, quisiera agradecer especialmente al **MCP. Alí Fernando Ruiz Higareda** por siempre apoyarme en el uso de las herramientas bioinformáticas y las 192 platicas amenas que tuvimos durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amistades de la Facultad de Medicina, a **Selene y Larli** por ser mis “*reales reales*”, mis cómplices en crimen de salidas e “*indecencias*”, gracias por los momentos compartidos, tanto los buenos como los no tan buenos, por todos los vinos, pelis, karaokes y cheves; espero que nuestra amistad dure por muchos años más, en verdad agradezco que “*entre todos los universos y vidas posibles, pudimos coincidir en esta*”.

A **Octavio**, por ser mi *gymbro*, mi “*dinocompa*” y acompañante de esta etapa, gracias por tus consejos y por el tiempo compartido. A **Luis**, un “*compa hecho y derecho*”, gracias por las experiencias que vivimos los últimos meses de la maestría; a **Aldair** y **Oscar** por las aventuras y cotorreo de los primeros semestres; a **Adriana**, por las pláticas de chismecillo y por enviarnos Tiktoks todos los días.

A **Carlos** y **Magda**, por sus reflexivas conversaciones y por compartir conmigo sus conocimientos de la vida. A **Julio**, mi hermano en la secuenciación, por las vivencias y aprendizajes mutuos en mi último año en CIIVIM; y a mis demás amistades y compañeros, por el tiempo y experiencias compartidas en este viaje: **Jona, Sofía, Juan de Dios, Sergio, Itzel, Jesús, Sebastián, Mich, Christopher, Sindy, Luis Ruelas, Pedro, Laura, Yajaira, Karla, Gustavo, Guillermo, Aidée, Alfonso, Paola, Daniel, Mike y Adela.**

A mis amistades de TecSalud, **Elizeth, Robbi** y **Diana**, por sus memes, *reels* y buenos deseos, aun y en la distancia.

A las Dras. **Patricia Zambrano, Patricia Esquivel** y **Sandra Santuario**, por sus cartas de recomendación y buenos deseos durante mi postulación al posgrado.

A mi familia biológica, mis padres **Máximo Hernández** e **Inocencia Altamirano**, y mi hermana **Edith**, así como a mi familia adquirida, **Esmeralda, Francis, Miguel, Jorge** y **Héctor**, quienes me han ofrecido su apoyo incondicional en todas mis decisiones.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron a mi estancia y realización de mi trabajo de grado. Sin su apoyo y aliento, este logro no habría sido posible.

Este trabajo está dedicado a todos ustedes, con gratitud y aprecio.

... en esta vida.

*Just be a rock.*  
**NOTHING MATTERS**

*Lost in Transcription*

Soundtrack: "This Is A Life" by Son Lux with Mitski & David Byrne



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>16</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
Introducción .....	17
Epidemiología mundial y de México .....	20
Temporada de influenza 2022 – 2023 en México.....	20
Cuadro clínico .....	23
Ciclo viral.....	24
• Entrada del virus a la célula hospedera.....	24
• Transcripción viral.....	24
• Replicación del genoma viral.....	25
• Traducción de las proteínas virales .....	26
• Maduración y liberación viral .....	26
Reordenamiento genético, deriva y cambio antigénico en virus de Influenza A .....	27
Papel del sistema inmunológico en la infección .....	28
Técnicas de identificación del virus de influenza .....	29
Diagnóstico clínico y por laboratorio.....	29
• Pruebas rápidas de antígeno.....	29
• Reacción de la Cadena de la Polimerasa con Retro Transcripción (RT-qPCR):.....	29

• Secuenciación de genoma viral: .....	29
Secuenciación de tercera generación para la vigilancia epidemiológica	30
Tratamiento y prevención .....	<b>31</b>
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS .....</b>	<b>32</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
General .....	35
Específicos .....	35
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
Tipo de estudio.....	37
Recolección de muestras .....	37
Criterios .....	37
• Inclusión .....	37
• Exclusión .....	37
• Eliminación .....	37
Selección de muestras .....	37
Información demográfica.....	38
<b>FASE I: PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS Y SECUENCIACIÓN.....</b>	<b>39</b>
• Extracción de ARN .....	39
• RT-PCR multisegmento.....	39
• Ligación y preparación de la biblioteca.....	42
• Secuenciación .....	46
<b>FASE II: ENSAMBLE, PULIDO, ANOTACIÓN DE GENOMAS Y</b>	
<b>ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....</b>	<b>46</b>

• Ensamble por referencia.....	46
• Pulido de secuencias.....	46
• Anotación de genomas virales.....	47
• Reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud y Credibilidad de Clado del virus de Influenza A.....	47
<b>FASE III: ANÁLISIS DE RESISTENCIA A LOS ANTIVIRALES .....</b>	<b>48</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
Cuantificación y verificación de patrón de bandas de amplicones. ....	49
Lecturas de muestras secuenciadas .....	53
Subtipificación viral de las secuencias obtenidas.....	54
Análisis filogenético.....	55
1. PB2 (Polimerasa Básica 2).....	56
2. PB1 (Polimerasa Básica 1).....	59
3. PA (Polimerasa Ácida).....	62
4. HA (Hemaglutinina).....	65
5. NP (Nucleoproteína).....	68
6. NA (Neuraminidasa).....	71
7. M (Proteína de Matriz 1 y 2).....	74
8. NS (No Estructural 1 y 2).....	77
Mutaciones encontradas en los aislados secuenciados.....	80
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
1. Genomas de referencia.....	90
2. Línea de comando para ensamble por referencia.....	91



3. Secuencias cargadas a NCBI GenBank.....	93
4. Metadatos de secuencias.....	94
4.1 PB2 (Polimerasa Básica 2).....	94
4.2 PB1 (Polimerasa Básica 1).....	96
4.3 PA (Polimerasa Ácida).....	98
4.4 HA (Hemaglutinina).....	100
4.5 NP (Nucleoproteína).....	102
4.6 NA (Neuraminidasa).....	104
4.7 M (Proteína de Matriz).....	106
4.8 NS (No Estructural 1 Y 2).....	108
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>110</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Segmentos del genoma viral y proteínas codificadas.....	19
<b>Tabla 2.</b> Cebadores específicos para virus de Influenza A. ....	39
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de cebadores para Influenza A. ....	39
<b>Tabla 4.</b> Mezcla maestra para RT-PCR de Influenza A.....	40
<b>Tabla 5.</b> Programa para RT-PCR Influenza A. ....	40
<b>Tabla 6.</b> Cuantificación de amplicones de genoma completo de virus de Influenza A. ....	49
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones de las bibliotecas previas a secuenciación. ....	52
<b>Tabla 8.</b> Lecturas con QS $\geq$ 8 por código de barras. ....	53
<b>Tabla 9.</b> Subtipos virales de las muestras secuenciadas. ....	54
<b>Tabla 10.</b> Mutaciones encontradas para los segmentos de Polimerasa Ácida, Hemaglutinina y Neuraminidasa. ....	81
<b>Tabla 11.</b> Números acceso de genomas de referencia para cada tipo y segmento viral. ....	90
<b>Tabla 12.</b> Números de acceso para secuencias cargadas a GenBank. ....	93
<b>Tabla 13.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB2, subtipo H3N2.....	94
<b>Tabla 14.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB2, subtipo H1N1pdm09.....	95
<b>Tabla 15.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB1, subtipo H3N2.....	96
<b>Tabla 16.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB1, subtipo H1N1pdm09.....	97
<b>Tabla 17.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PA, subtipo H3N2.....	98
<b>Tabla 18.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PA, subtipo H1N1pdm09.....	99
<b>Tabla 19.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de HA, subtipo H3N2.....	100

<b>Tabla 20.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de HA, subtipo H1N1pdm09.....	101
<b>Tabla 21.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NP, subtipo H3N2.....	102
<b>Tabla 22.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NP, subtipo H1N1pdm09.....	103
<b>Tabla 23.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NA, subtipo H3N2.....	104
<b>Tabla 24.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NA, subtipo H1N1pdm09.....	105
<b>Tabla 25.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de M, subtipo H3N2. .....	106
<b>Tabla 26.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de M, subtipo H1N1pdm09.....	107
<b>Tabla 27.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NS, subtipo H3N2.....	108
<b>Tabla 28.</b> Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NS, subtipo H1N1pdm09.....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del virus de Influenza A.....	18
<b>Figura 2.</b> Curva epidémica de casos confirmados a influenza por semana epidemiológica.....	21
<b>Figura 3.</b> Circulación de subtipos de virus de Influenza en México, Temporada de influenza estacional 2022-2023. ....	22
<b>Figura 4.</b> Esquema general del ciclo viral del virus de influenza.....	25
<b>Figura 5.</b> Deriva antigénica (Drift) y cambio antigénico (shift).....	27
<b>Figura 6.</b> Diagrama experimental general. ....	36
<b>Figura 7.</b> Gel 1: Patrón de bandas correspondientes a los segmentos virales. 50	
<b>Figura 8.</b> Gel 2: Patrón de bandas correspondientes a los segmentos virales. 50	
<b>Figura 9.</b> Gel 3: Patrón de bandas correspondientes a los segmentos virales. 51	
<b>Figura 10.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB2, subtipo H3N2.....	57
<b>Figura 11.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB2, subtipo H1N1pdm09.....	58
<b>Figura 12.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB1, subtipo H3N2.....	60
<b>Figura 13.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB1, subtipo H1N1pdm09.....	61
<b>Figura 14.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PA, subtipo H3N2.....	63
<b>Figura 15.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PA, subtipo H1N1pdm09.....	64
<b>Figura 16.</b> Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de HA, subtipo H3N2. ....	66
<b>Figura 17.</b> Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de HA, subtipo H1N1pdm09. ....	67
<b>Figura 18.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NP, subtipo H3N2.....	69

<b>Figura 19.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NP, subtipo H1N1pdm09.....	70
<b>Figura 20.</b> Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de NA, subtipo H3N2. ....	72
<b>Figura 21.</b> Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de NA, subtipo H1N1pdm09. ....	73
<b>Figura 22.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de M, subtipo H3N2.....	75
<b>Figura 23.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de M, subtipo H1N1pdm09.....	76
<b>Figura 24.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NS, subtipo H3N2.....	78
<b>Figura 25.</b> Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NS, subtipo H1N1pdm09.....	79

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

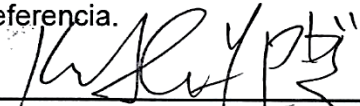
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
<b>AMII</b>	Adapter Mix II
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNv</b>	Ácido Ribonucleico Viral
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CDC</b>	Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos
<b>CENAPRECE</b>	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
<b>EB</b>	Buffer de Elución
<b>g</b>	Gramos
<b>GISAID</b>	Sistema Global de Vigilancia y Respuesta ante la Influenza (Global Initiative on Sharing All Influenza Data)
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<b>NGS</b>	Secuenciación de siguiente generación (Next Generation Sequencing)
<b>nt</b>	nucleótidos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>QS</b>	Puntuación de Calidad (Quality Score)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
<b>SFB</b>	Short Fragment Buffer (Tampon de Fragmentos Cortos)
<b>SINAVE</b>	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
<b>TBE</b>	Tris/borato/EDTA

## RESUMEN

**Título: “Secuenciación genómica de aislados de virus de Influenza A en la zona metropolitana de Monterrey: Análisis filogenético y su relación con la resistencia a los antivirales”**

Número de páginas: 115

**Introducción:** La vigilancia genómica del virus de Influenza A es esencial en la salud pública para rastrear su evolución y propagación. A través de la secuenciación del genoma completo, se pueden detectar cambios genéticos que pueden influir en la transmisibilidad, virulencia y resistencia a los antivirales. Además, permite seguir la evolución de las cepas en circulación e identificar tempranamente variantes resistentes a medicamentos, lo cual es vital para implementar estrategias de control efectivas y desarrollar vacunas actualizadas. **Objetivo:** Determinar las secuencias genéticas de aislados de virus de Influenza A de personas infectadas de la zona metropolitana de Monterrey durante la temporada de Influenza 2022 - 2023, así como conocer sus relaciones filogenéticas y detectar la presencia de mutaciones que le confieren resistencia a los antivirales. **Metodología:** Se analizaron 15 muestras positivas a virus de Influenza A del periodo de Influenza 2022 - 2023, provenientes del repositorio del servicio de Infectología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" UANL. El genoma viral aislado fue amplificado mediante RT-PCR multisegmento con cebadores específicos para virus de Influenza A. Se secuenciaron a través de la plataforma Oxford Nanopore y el kit SQK-LSK109. Posteriormente, se llevó a cabo el llamado de bases mediante Dorado, seguido del ensamblado de secuencias por referencia a través de las herramientas minimap2, medaka y samtools. Finalmente, se construyeron árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud con IQTree2 para los genes internos (PB2, PB1, PA, NP, M y NS) y de Máxima Credibilidad de Clado para los genes de superficie (HA y NA) con BEAST1. Paralelamente, se realizó un análisis de mutaciones candidatas epidemiológica y fenotípicamente relevantes utilizando la plataforma Flusurver de GISAID. **Resultados:** Se obtuvieron 8 secuencias completas y 7 parciales del virus de Influenza A, 14 aislados correspondieron al subtipo H3N2 y 1 al subtipo H1N1pdm09. Los análisis filogenéticos revelaron introducciones a la zona metropolitana de Monterrey entre octubre y diciembre de 2022, provenientes mayormente de Estados Unidos. Además, los análisis de mutaciones no mostraron cambios en la secuencia genómica que le confirieran resistencia a los antivirales oseltamivir, zanamivir y baloxavir. Sin embargo, se observaron mutaciones asociadas con mayor virulencia respecto a las cepas de referencia. **Conclusiones:** Se determinaron 106 segmentos del virus de Influenza A, identificando 14 muestras del subtipo H3N2 y una de H1N1pdm09. Los aislados correspondían mayormente a clados del hemisferio norte de la temporada invernal 2022-2023. No se detectaron mutaciones de resistencia a antivirales como oseltamivir, zanamavir o baloxavir, pero sí mutaciones que aumentan la virulencia comparada con las cepas de referencia.



---

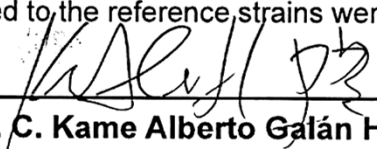
**Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**  
Director de tesis

## ABSTRACT

Title: “**Genomic sequencing of influenza A virus isolates from the metropolitan area of Monterrey: phylogenetic analysis and its relationship with antiviral resistance**”

Number of pages: **115**

**Introduction:** Genomic surveillance of the Influenza A virus is essential for public health to track its evolution and spread. Through whole genome sequencing, genetic changes that may influence transmissibility, virulence, and antiviral resistance can be detected. Additionally, it allows for monitoring the evolution of circulating strains and the early identification of drug-resistant variants, which is vital for implementing effective control strategies and developing updated vaccines. **Aim:** To determine the genetic sequences of Influenza A virus isolates from infected individuals in the metropolitan area of Monterrey during the 2022-2023 Influenza season, to understand their phylogenetic relationships, and to detect the presence of mutations that confer resistance to antivirals. **Methods:** Fifteen Influenza A virus-positive samples from the 2022-2023 influenza season, sourced from the repository of the Infectious Diseases Department of the Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" UANL, were analyzed. The isolated viral genome was amplified by multisegment RT-PCR with specific primers for the Influenza A virus. Sequencing was performed using the Oxford Nanopore platform. Subsequently, basecalling was performed using Dorado, followed by sequence assembly by reference using the minimap2, medaka, and samtools tools. Finally, Maximum Likelihood phylogenetic trees were constructed with IQTree2 for internal genes (PB2, PB1, PA, NP, M, and NS) and Maximum Clade Credibility trees for surface genes (HA and NA) with BEAST1. In parallel, an analysis of epidemiologically and phenotypically relevant candidate mutations was performed using GISAID's Flusurver platform. **Results:** Eight complete and seven partial sequences of the Influenza A virus were obtained. Fourteen isolates corresponded to the H3N2 subtype and one to the H1N1pdm09 subtype. Phylogenetic analyses revealed introductions to the metropolitan area of Monterrey between October and December 2022, primarily from the United States. Mutation analyses showed no genomic changes conferring resistance to antivirals oseltamivir, zanamivir, and baloxavir. However, mutations associated with increased virulence compared to reference strains were observed. **Conclusions:** A total of 106 segments of the Influenza A virus were identified, with fourteen samples of the H3N2 subtype and one of the H1N1pdm09 subtype. The isolates mostly corresponded to clades from the northern hemisphere of the 2022-2023 winter season. No resistance mutations to antivirals such as oseltamivir, zanamivir, or baloxavir were detected, but mutations that increase virulence compared to the reference strains were identified.



---

**Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**  
Director de tesis



## ANTECEDENTES

### Introducción

Durante la temporada invernal, los virus respiratorios representan una carga significativa para la salud pública a nivel mundial. Estos agentes patógenos, son responsables de una variedad de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior en seres humanos. La temporada invernal aumenta la incidencia de enfermedades respiratorias, debido a que propicia el hacinamiento de personas haciendo más probable la transmisión de patógenos que se transportan en gotículas respiratorias.

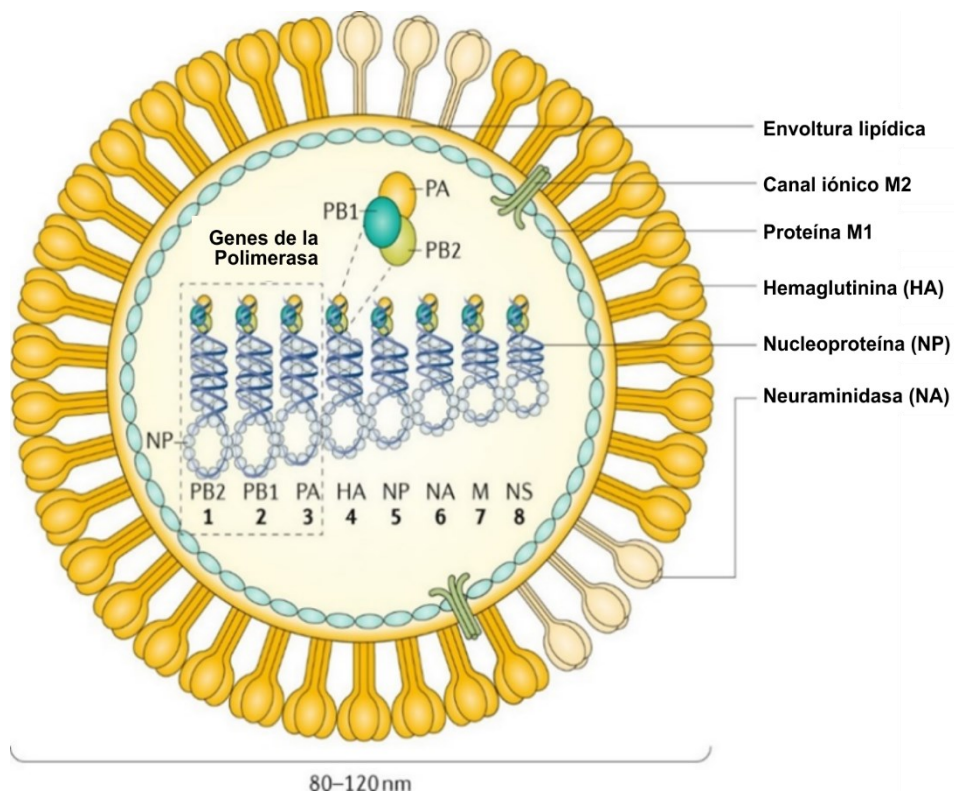
Los virus respiratorios pueden causar desde infecciones leves, como resfriados comunes, hasta enfermedades graves que pueden resultar en hospitalización e incluso la muerte, especialmente en poblaciones vulnerables como personas en los extremos de la vida o con sistemas inmunitarios debilitados.

Estos agentes virales tienen diversas características de transmisión, manifestaciones clínicas y gravedad de la enfermedad (PAHO/WHO, 2022).

Entre los virus más comúnmente asociados con infecciones respiratorias invernales se encuentran los Virus de la Influenza, se han descrito cuatro virus de influenza que causan infección en humanos (A, B, C y D). El de mayor relevancia clínica es el tipo A, debido a que es el agente causal de los brotes estacionales en invierno, además de tener mayor variabilidad en sus proteínas antigénicas y genoma debido al fenómeno de reordenamiento con otros virus del mismo tipo. Tal es el caso cuando el virus circula en animales no humanos como cerdos, aves migratorias o de consumo, que de manera esporádica causan pandemias como la ocurrida en 2009 por el virus de Influenza A H1N1 de origen zoonótico (NCIRD, 2023).

Los virus de Influenza A son virus envueltos con genoma segmentado de ARN monocatenario de sentido negativo agrupados dentro de la familia *Orthomyxoviridae*. Posee ocho segmentos ubicados dentro del virión. En la tabla 1 se mencionan los productos codificados por dichos segmentos. Las proteínas

de principal importancia son Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) ya que son las de mayor variabilidad antigénica. Estas se encuentran en la superficie del virus y son blanco de anticuerpos neutralizantes producidos por vacunación o infección previa. HA entra en contacto con el receptor de ácido siálico de la célula epitelial respiratoria del hospedero iniciando su internalización y posterior replicación dentro de la misma. Por otro lado, NA es la responsable de la propagación extracelular, en la figura 1 se representa la estructura general del virión (Krammer *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Estructura del virus de Influenza A. Obtenida de Krammer *et al.*, 2018.

Estos virus generan cuadros respiratorios leves con síntomas que van desde fiebre, faringitis, mialgias, rinorrea, cefalea, tos y fatiga hasta insuficiencia respiratoria y neumonía bacteriana secundaria, que ponen en riesgo la vida. Los grupos de riesgo de complicación son personas que viven con enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, inmunosupresión (en tratamiento con quimioterapéuticos o fármacos esteroides,

con infección por VIH sin tratamiento antirretroviral), embarazadas e infantes menores a 59 meses (Ruiz-Matus *et al.*, 2017).

El principal mecanismo de transmisión es por medio de gotas de secreciones respiratorias expulsadas por las personas enfermas cuando tosen o estornudan. La infección sucede cuando una persona sana entra en contacto con dichas secreciones, sobre todo en espacios cerrados y con poca ventilación, así como el contacto estrecho persona – persona, a una distancia menor a 1.5 metros de distancia. Una de las estrategias de prevención de pandemias por virus de Influenza A, es la epidemiología molecular apoyada por herramientas como la secuenciación genómica, rastreo de grupos o clados, así como análisis filogenéticos. Esto para la toma de decisiones y la generación de políticas en materia de salud pública, así como en el desarrollo de vacunas anuales y su aplicación en las poblaciones de riesgo y personal de salud (CDC, 2022).

**Tabla 1.** Segmentos del genoma viral y proteínas codificadas. Obtenida de Krammer *et al.*, 2018.

Segmento del genoma	PROTEÍNA VIRAL
1	PB2 (Polimerasa Básica 2)
2	PB1 (Polimerasa Básica 1)
3	PA (Polimerasa Acida)
4	HA (Hemaglutinina)
5	NP (nucleoproteína)
6	NA (Neuraminidasa)
7	M1/M2 (Proteína de Matriz 1 y 2)
8	NS1/NS2 (Proteína No Estructural 1 y 2)

## **Epidemiología mundial y de México**

Alrededor del mundo, la Influenza estacional ocasiona cerca de 700,000 muertes y 1000 millones de casos, de los cuales 5 millones son de casos graves. Por ello es de relevancia la vigilancia de los cuadros respiratorios leves y graves en los sistemas de salud de cada país, debido al impacto en la economía, el bienestar poblacional y la dinámica social, así como en la interconectividad entre países (OMS, 2019).

Históricamente, el virus tipo A ha causado diversas pandemias en regiones del mundo, tal es el caso de la “gripe de Hong Kong” (A H3N2) donde se reportó cerca de 4 millones de muertes en 1968. Por otro lado, en 1919-1920 la “gripe española” dejó alrededor de 50 millones de muertes. En recientes décadas, la pandemia por Influenza A H1N1 pandémica del 2009, causó cerca de 300 mil muertes de manera desproporcionada en adultos mayores más que en adultos jóvenes. La evidencia sugiere que esta cepa se originó a partir de un reordenamiento de un virus porcino con uno humano, la cual fue reportada por primera vez en México (Tyrrell *et al.*, 2021).

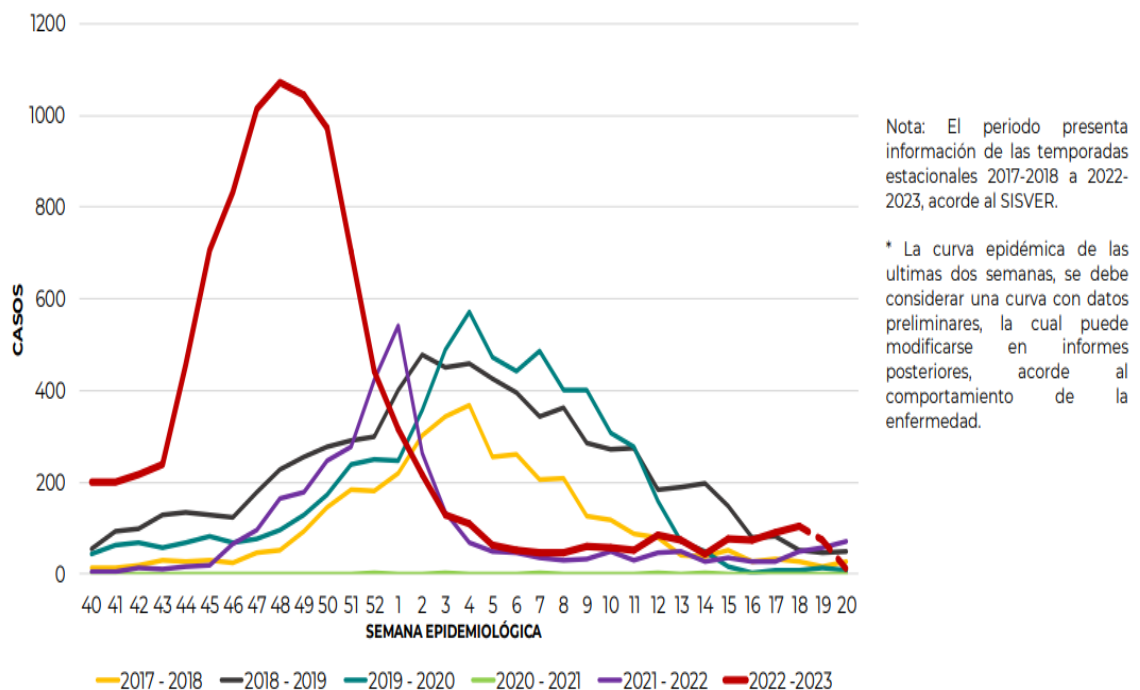
Durante la pandemia por la COVID-19, se observó una reducción de incidencia en casos reportados de influenza estacional. Esto debido a las intervenciones realizadas por los gobiernos en cuanto a distanciamiento social y aumento en la prevención no farmacológica como el lavado de manos y la normalización de la etiqueta respiratoria aunado al uso generalizado de cubrebocas (Davis *et al.*, 2022).

## **Temporada de influenza 2022 – 2023 en México**

En México, se reportan cerca de 10,000 casos de influenza cada año, notándose una dinámica cambiante entre los subtipos A H3N2 y A H1N1pdm09 (Ruiz-Matus *et al.*, 2017). Como parte de los aprendizajes obtenidos de la pandemia de Influenza A H1N1pdm09, se pusieron en acción diferentes mecanismos de vigilancia epidemiológica de la Enfermedad Similar a Influenza (ESI) en las

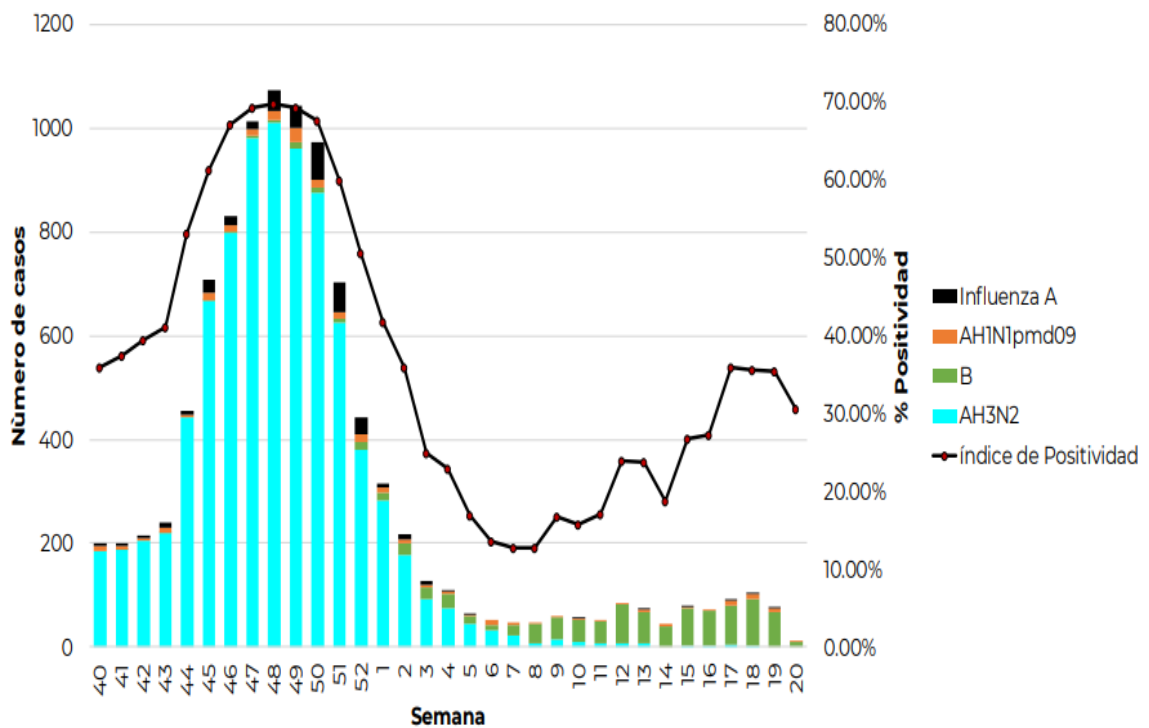
Unidades de Salud Monitoras de Enfermedad Respiratoria Viral (USMER) del todo el país, donde se toma de forma representativa el 10% de los casos de ESI y el 100% las infecciones respiratorias aguda grave (IRAG); esto para tener conocimiento sobre las cepas circulantes en las diversas regiones del país (CENAPRECE, 2013).

La temporada de Influenza 2022 - 2023, se consideró entre la semana epidemiológica 40 del 2022 (2 de octubre) a la 20 del 2023 (20 de mayo). En este lapso se reportó por parte de la Dirección General de Epidemiología (DGE) 437,602 casos de Enfermedad Similar a Influenza e Infección Respiratoria Aguda Grave, de los cuales el 2.3% (9,877 casos) correspondieron a Influenza confirmada por laboratorio, en la figura 2 se observa los casos confirmados por semana epidemiológica.



**Figura 2.** Curva epidémica de casos confirmados a influenza por semana epidemiológica. Obtenido de Dirección General de Epidemiología, 2023.

De los casos positivos por laboratorio, los subtipos se distribuyeron en 84.3% para Influenza A H3N2, 3.8% a Influenza A No Subtipificable y al 2.7% a Influenza A H1N1pdm09 (figura 3). Por otro lado, la distribución de casos por entidad federativa, Nuevo León se encuentra en segundo lugar con 13.3% con respecto al número de casos confirmados por entidad de residencia.



**Figura 3.** Circulación de subtipos de virus de Influenza en México, Temporada de influenza estacional 2022-2023. Obtenido de Dirección General de Epidemiología, 2023.

\***Influenza A:** incluye influenza A, AH1 y A no subtipificable.

## **Características del virus de Influenza A**

Las variantes del virus de influenza A son de especial interés epidemiológico por su mutación y reordenamiento genómico. Esta habilidad de evolución y adaptación es debido a dos cualidades importantes. En primer lugar, la polimerasa dependiente de ARN posee una alta tasa de errores, dando como resultado cambios en las secuencias que codifican para las proteínas antigénicas. Por otro lado, el reordenamiento de los segmentos de ARN durante las coinfecciones, dan lugar a nuevas variantes virales. Estas cualidades le permiten al virus adaptarse y escapar de la inmunidad de sus hospederos (Uyeki *et al.*, 2022).

Se conoce que estos virus tienen una amplia variedad de hospederos tales como los animales de explotación humana (cerdos, gallinas, aves, hurones, cobayos, etc), aves migratorias y mamíferos acuáticos (Zhang *et al.*, 2021).

Ocasionalmente, los virus de los animales cruzan de forma circunstancial hacia las personas, provocando una zoonosis. Al adaptarse a la población humana, acumulan cambios genéticos y mejoran su transmisión, pudiendo ocasionar pandemias como la ocurrida en 2009 en México, donde se vio involucrado un reordenamiento de segmentos por un virus aviar, uno porcino y uno humano (Mena *et al.*, 2016).

## **Cuadro clínico**

La infección por virus de Influenza A se presenta generalmente en la clínica como una enfermedad respiratoria aguda, los síntomas comúnmente asociados son temperatura corporal mayor a 37.5°C, faringitis, mialgias, rinorrea, cefalea, tos y fatiga. En general, su tiempo de evolución es de 5 a 7 días, pero en las poblaciones de riesgo puede causar un cuadro grave que pone en peligro la vida, estimándose una tasa de mortalidad cercana al 0.2%. Al ser una infección de vías respiratorias superiores, deteriora el epitelio respiratorio ocasionando que

prosperen infecciones bacterianas secundarias de tracto respiratorio inferior, desencadenando una neumonía grave (WHO, 2022).

### **Ciclo viral**

En los seres humanos, la infección comienza cuando una persona infectada entra en contacto estrecho con una persona susceptible, esta ingiere las gotas de secreciones respiratorias y al entrar en contacto con las mucosas nasales o bucales inician la replicación viral en las células blanco (INSST, 2022).

### **Entrada del virus a la célula hospedera**

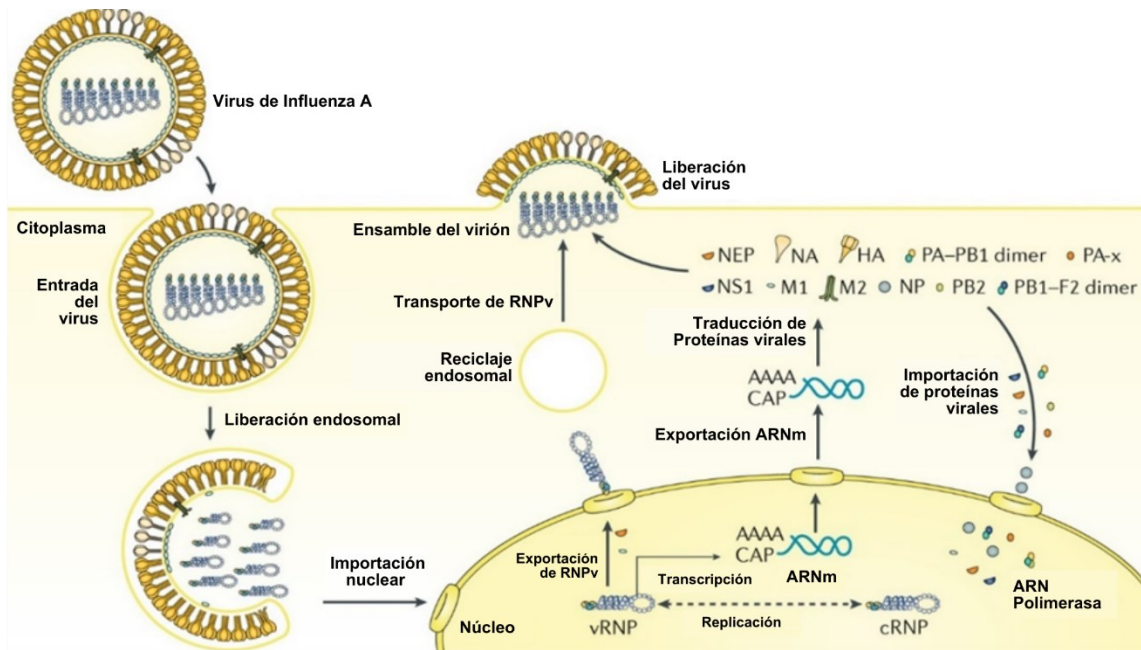
A nivel molecular, la proteína viral Hemaglutinina (HA) se une al receptor celular ácido siálico, el acoplamiento de estas moléculas desencadena la endocitosis del virión, una vez ingresada la partícula viral en la célula hospedera, se forma el complejo endosomal, que al tener un pH ácido procede a la fusión de membranas del virión y endosoma, mediada por los canales iónicos M2 por medio del cambio conformacional de trímero de HA. Este proceso libera el ARN viral (ARNv) y sus proteínas asociadas, al citoplasma celular. El complejo de ribonucleoproteínas (*RNP*) ingresan al núcleo por medio del poro nuclear con ayuda de las importinas  $\alpha$  y  $\beta$  (Meyerson *et al.*, 2017).

### **Transcripción viral**

La ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp, conformada por PB1, PB2 y PA), hace uso de un cebador proveniente del ARNm de la célula hospedera para iniciar la transcripción, este fragmento lo obtiene mediante el mecanismo "cap-*snatching*" mediado por la proteína PA, la cual corta el fragmento protegido del extremo 5' del ARNm celular, mientras que la proteína PB2 reconoce y se une a la estructura del CAP de dicho ARNm, y la PB1 es la subunidad de la RdRp que actúa de polimerasa. Por otro lado, la cola poli A se fabrica por medio de copiar repetidamente secuencias cortas de 6 a 7 uracilos a través de "shuttering", donde la polimerasa viral después de cada inserción de adenina retrocede y avanza, logrando así que un uracilo en la plantilla se copie ciento de veces para



producir la poliadenilación del ARN mensajero viral. Los ARNV resultantes se exportan al citoplasma y sirven de ARNm para la síntesis proteica (Reina & Reina, 2019).



**Figura 4.** Esquema general del ciclo viral del virus de influenza. Krammer *et al.*, 2018.

### Replicación del genoma viral

Este proceso, al igual que la transcripción, se da en el núcleo de la célula hospedadora, por lo que las proteínas esenciales deben importarse al organelo para que ésta ocurra y así aumentar la tasa de síntesis de ARN viral, estas comprenden a la proteína NP, RdRp, NS1 Y NEP. Posterior a la entrada de la *RNPv*, se sintetiza un intermediario de sentido positivo conocido como complejo de Ribonucleoproteína Complementaria (RNPc) usando como molde al ARNV de sentido negativo, este intermediario replicativo es posteriormente utilizado como plantilla para la síntesis de Ribonucleoproteínas virales (RNPv) nacientes, las cuales se exportan al citosol en forma de complejos con M1 y NEP mediante el Exportador Nuclear de Mantenimiento de la región Cromosómica 1 (CRM1).

La etapa siguiente a la exportación, las RNPv se envían al sitio de ensamblaje en la membrana apical por medio de la endosoma de reciclaje regulado por Rab11a, una vez en la membrana, M1 junto con las M2 juegan un importante rol en integrar el genoma viral en los viriones nacientes durante el ensamblado y posterior excreción (Chaimayo *et al.*, 2017).

### **Traducción de las proteínas virales**

La traducción del ARNm se lleva a cabo por dos vías, una es la vía citosólica que produce las proteínas PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 y M1, estas son translocadas al núcleo por medio de asociación con importinas anteriormente mencionadas; en contraparte, la vía asociada al retículo endoplásmico sintetiza HA, NA y M2, dichas proteínas están destinadas para configurar la envoltura viral. La conformación ribosoma-cadena naciente se direcciona gracias a la Partícula de Reconocimiento de Señal (SRP) en HA, mientras que NA y M2 poseen sus propios Dominios Transmembrana. Estos complejos se dirigen al receptor de SRP en el retículo endoplásmico, conduciéndolo al canal con la proteína Sec61 denominado translocón. Posterior a la síntesis proteica, estas se agrupan y se transportan al aparato de Golgi para finalmente trasladarse a la membrana plasmática. (Dou *et al.*, 2018).

### **Maduración y liberación viral**

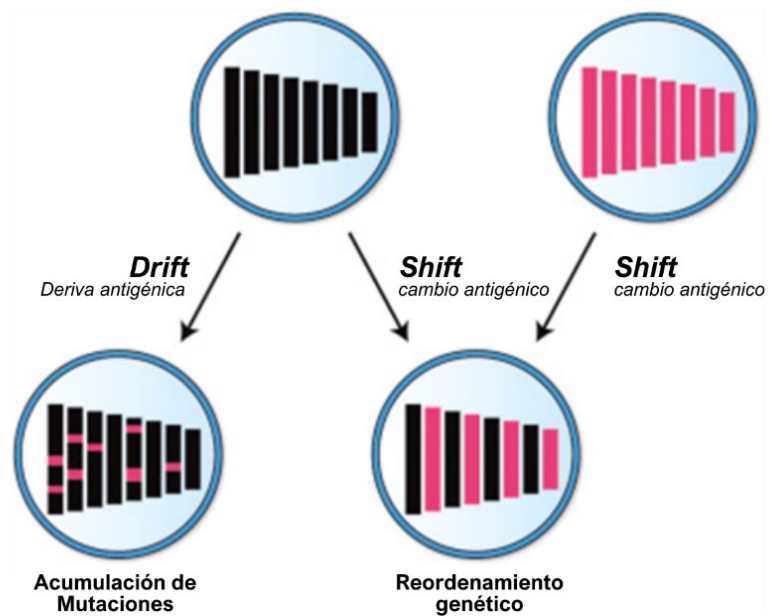
Para el ensamblaje del virión, los ARNv son exportados por medio de vesículas formadas por Rab11 asociada a microtúbulos, mediante el mecanismo denominado “transporte citoplasmático”, estos segmentos son entregados a la periferia y posiblemente se unen a M1 en el sitio de gemación. Una vez organizado este ensamblaje, la formación del virión se da por medio de la abundante presencia de HA, NA y M1 en la membrana citoplasmática provocando el doblamiento de esta junto con M2, dicha proteína ha demostrado

su participación en la liberación de viriones por medio de funcionar como proteína de flexión de membrana (Han *et al.*, 2021).

Para la liberación del virión, es necesaria la actividad catalítica de NA, ya que esta proteína hidroliza el enlace glucosídico que une al ácido siálico a las moléculas de azúcar subyacentes, esto evita que HA se una a la superficie celular facilitando la gemación viral (McAuley *et al.*, 2019).

### Reordenamiento genético, deriva y cambio antigénico en virus de Influenza A

Cuando una célula se coinfecta de dos virus de influenza de subtipos diferentes, genera un virus reordenado durante el proceso de ensamblado de segmentos de ARN viral, provocando un *reordenamiento genético*. Tal es el caso de lo ocurrido en la pandemia de 2009, donde los cerdos se infectaron simultáneamente con un virus aviar y uno humano, resultando una variante con nueva antigenicidad (Ganti *et al.*, 2022).



**Figura 5.** Deriva antigénica (Drift) y cambio antigénico (shift). Ryu, 2017.

Por otro lado, cuando hay una acumulación gradual de mutaciones en las proteínas HA y NA durante las infecciones, ocasiona cambios progresivos e incrementales de la antigenicidad, este proceso provoca la deriva antigénica (*Antigenic drift*). Este proceso genera las variantes de la influenza estacional. En contraste, el cambio antigénico (*Antigenic shift*), hace referencia a los cambios drásticos en la antigenicidad derivado del reordenamiento genético, provocando variantes que generalmente causan pandemias. Tal fue el caso del brote de gripe asiática a finales de 1950, donde se transfirieron segmentos de la gripe aviar al virus que infectó a los seres humanos (CDC, 2022b).

### **Papel del sistema inmunológico en la infección**

Los virus de influenza han desarrollado diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune de sus diferentes hospederos. En los seres humanos, se ha reportado que la proteína NS1, es responsable del bloqueo de la respuesta inmune innata por medio de mecanismos de producción de interferón, en primer lugar inhibe la ubiquitinización de RIG-1 al interaccionar con TRIM25, lo que desencadena una supresión de la inducción de interferón; en segundo lugar, NS1 inhibe la acción antiviral mediada por PKR y 2'5'OAS, esto por medio interferir con el secuestro de la doble cadena de ARN, la cual es esencial para la activación de ambas moléculas, logrando así el bloqueo del mecanismo antiviral (Ji *et al.*, 2021).

## Técnicas de identificación del virus de influenza

### Diagnóstico clínico y por laboratorio

Para el diagnóstico en atención ambulatoria, generalmente no es necesaria hacer una prueba confirmatoria, debido a que este cuadro sintomatológico se engloba en “Enfermedad similar a Influenza” y dependiendo del paciente, se borda a un tratamiento sintomático (CDC, 2020). De acuerdo con la Guía de Práctica Clínica para enfermedades infecciosas de Estados Unidos, existen diferentes métodos para la identificación del virus de influenza, las cuales influye:

- **Pruebas rápidas de antígeno:** estas pruebas están basadas en la detección de antígenos virales, especialmente la proteína de la nucleocápside. En este tipo de pruebas los resultados son obtenidos en minutos y se puede realizar en el punto de atención. Aunque su sensibilidad y especificidad es limitada, respecto a las pruebas moleculares, son de utilidad cuando se requiere conocer si un paciente con riesgo de complicación está infectado con el virus de influenza.
- **Reacción de la Cadena de la Polimerasa con Retro Transcripción (RT-qPCR):** prueba molecular basada en la amplificación y detección de ácidos nucleicos específicos de los virus de influenza (ARNv), es considerado el método de referencia y diagnóstico definitivo de la infección. Esta técnica permite diferenciar diferentes tipos y subtipos del virus y proporciona alta sensibilidad y especificidad.
- **Secuenciación de genoma viral:** esta técnica permite conocer la secuencia específica de nucleótidos del genoma del virus de Influenza, el enfoque de esta prueba está orientada en la investigación de variantes y características genéticas del virus. La secuenciación de nueva generación (NGS), es una herramienta novedosa para obtener secuencias completas de manera rápida y eficiente, tal es el caso de la secuenciación con nanoporos.

Las pruebas de laboratorio pueden variar en cuanto al entorno e infraestructura de las instalaciones hospitalarias, así como la finalidad de la prueba. En algunos casos, se pueden combinar estas pruebas para un seguimiento clínico específico. Tal es el caso de la detección rápida de antígenos como preámbulo a una confirmación por PCR y secuenciación genómica para la vigilancia epidemiológica (Uyeki *et al.*, 2019).

### **Secuenciación de tercera generación para la vigilancia epidemiológica**

La secuenciación de nueva generación es aquella técnica de secuenciación genómica que permite hacer un análisis simultáneo de cambios genéticos, mutaciones, reordenamientos genómicos o inserciones y deleciones de un genoma dado.

Esta tecnología genómica, se puede categorizar en tres generaciones, siendo la de tercera generación la más adecuada para obtener secuencias en menor tiempo y con capacidad de portabilidad. Esto es de crucial interés en ambientes donde no se dispone de infraestructura para llevar a cabo análisis especializados. En años recientes la secuenciación por nanoporos, ha revolucionado la forma de llevar a cabo la obtención de secuencias. A pesar de seguir en optimización, este método permite conocer el orden nucleotídico de forma directa, a bajo costo y en tiempo real. Además, posee la ventaja de obtener secuencias de longitud mayor a otros métodos (Pervez *et al.*, 2022).

En el contexto de la vigilancia epidemiológica, la NGS permite el rastreo preciso y rápido de las cepas circulantes del virus de influenza para un espacio y tiempo de interés.

Es útil en brotes y epidemias, donde la caracterización de la variante viral es crucial para la toma de decisiones en el control y contención, dando así información para el análisis de propagación, relación filogenética e identificación de cepas virulentas o que presenten resistencia a las terapias ya conocidas (Comas *et al.*, 2020).

## **Tratamiento y prevención**

### **Terapias farmacológicas y prevención con vacunas**

El abordaje farmacológico sugerido en México se centra en tratar a pacientes con sospecha o diagnóstico confirmatorio, que por sus características clínicas tienen alto riesgo de desarrollar enfermedad grave, la terapia con inhibidores de la neuraminidasa debe iniciar dentro de las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas, ya sea con oseltamivir oral o zanamivir inhalada con dosis ajustadas a las características del paciente (edad, peso y vía de administración).

En años recientes, se ha propuesto el uso de Baloxavir marboxil en dosis única, sin embargo, solo hay evidencia para el uso en pacientes mayores a 12 años (Anzures Gutiérrez *et al.*, 2020).

El sistema de salud mexicano recomienda la vacunación contra influenza en poblaciones de riesgo y personal de salud, esto para prevenir el ingreso hospitalario y reducir las complicaciones médicas atribuibles a la enfermedad grave. Por ello, al inicio de la temporada de Influenza en México (octubre 2022 – mayo 2023), se realizan campañas de vacunación masiva, empezando por personas adultas mayores, infantes, personal de salud y personas con inmunocompromiso (Anzures Gutiérrez *et al.*, 2020).

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro equipo de trabajo se han realizado estudios epidemiológicos del virus de Influenza A. En 2021, Arellanos-Soto *et al.* analizaron los casos de influenza en relación con la pandemia de COVID-19. Se encontró una disminución significativa en los casos de influenza, atribuida a la implementación de medidas de contención como el distanciamiento social, el uso de mascarillas y mejores prácticas de higiene. Estas medidas, diseñadas originalmente para combatir la transmisión del SARS-CoV-2, también resultaron efectivas para reducir la propagación de la influenza.

En 2021, Álvarez-Salas *et al.* realizaron un análisis detallado de la epidemiología de la influenza en la región norte de México. En este estudio, se recolectaron datos de vigilancia desde 2010 hasta 2016, proporcionando información sobre la variabilidad de la incidencia anual, los patrones estacionales y los principales subtipos predominantes en cada temporada. Además, se identificaron los grupos de edad más afectados en cada período.

Asimismo, en 2022, Álvarez-Salas secuenció cuatro genomas parciales de aislados de virus de Influenza A H1N1pdm09 de la temporada 2016-2017 utilizando secuenciación de Sanger con electroforesis capilar. En este análisis, examinó la filogenia de los segmentos de hemaglutinina y proteína de matriz, encontrando que estos se agruparon en clados con cepas similares a las que circulaban en Estados Unidos durante la misma temporada. Además, realizó un análisis dirigido de mutaciones en el segmento de neuraminidasa, descartando la presencia de mutaciones que confirieran resistencia al antiviral oseltamivir.

Estos estudios han permitido elucidar la dinámica epidemiológica de los diversos subtipos del virus de Influenza A, en México particularmente en la región de Nuevo León. Por lo tanto, secuenciar el genoma completo permitirá conocer y entender a nivel genómico las variaciones a través del tiempo, así como identificar cepas que pudieran comprometer la eficacia de los tratamientos actuales y las vacunas aplicadas en la temporada 2022-2023.



## JUSTIFICACIÓN

La Influenza, representa un desafío constante para la salud pública debido a su capacidad de generar cuadros graves, especialmente en poblaciones de riesgo como las personas adultas mayores, infantes, mujeres embarazadas y personas que viven con enfermedades crónicas. Además de representar una carga importante en los sistemas de salud a nivel mundial durante las estaciones invernales.

Los virus de Influenza A destacan por su rápida capacidad de adaptación y mutación genómica. Esta característica les permite generar cepas que pueden evadir la acción de los antivirales y vacunas utilizados actualmente, lo que complica el tratamiento y control de la enfermedad.

Es por ello, que la investigación de las variantes de virus de Influenza A es crucial para comprender y abordar eficazmente esta infección. La investigación debe estar orientada a conocer las secuencias de las cepas circulantes en una región con amplia dinámica social, como lo es la zona metropolitana de Monterrey. Esta delimitación geográfica es particularmente significativa debido a su alta densidad de población y movilidad, factores que facilitan la propagación del virus. Comprender la epidemiología molecular del virus de Influenza A, arrojaría información sobre sus características genómicas, comportamiento epidemiológico, permitiendo así identificar la evolución viral y, lo que es crucial, anticipar la emergencia de cepas con potencial pandémico.

## **HIPÓTESIS**

Los aislados del virus de Influenza A circulantes en temporada de Influenza 2022 - 2023 en la zona metropolitana de Monterrey presentan mutaciones que le confieren resistencia a la acción de los fármacos antivirales (oseltamivir, zanamivir y baloxavir marboxil).

## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar las secuencias genéticas de aislados de virus de Influenza A de personas infectadas de la zona metropolitana de Monterrey durante la temporada de Influenza 2022 - 2023, así como conocer sus relaciones filogenéticas y detectar la presencia de mutaciones que le confieren resistencia a los antivirales oseltamivir, zanamivir y baloxavir marboxil.

### **Específicos**

1. Determinar las secuencias genéticas de aislados de virus de Influenza A circulantes en la zona metropolitana de Monterrey en el periodo de Influenza 2022 – 2023 por medio de secuenciación de tercera generación.
2. Establecer las relaciones filogenéticas de aislados de virus de Influenza A de la zona metropolitana de Monterrey durante el periodo de Influenza 2022 – 2023.
3. Identificar mutaciones en el genoma viral de los aislados de virus de Influenza A que la confieran resistencia a los antivirales oseltamivir, zanamivir y baloxavir marboxil.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

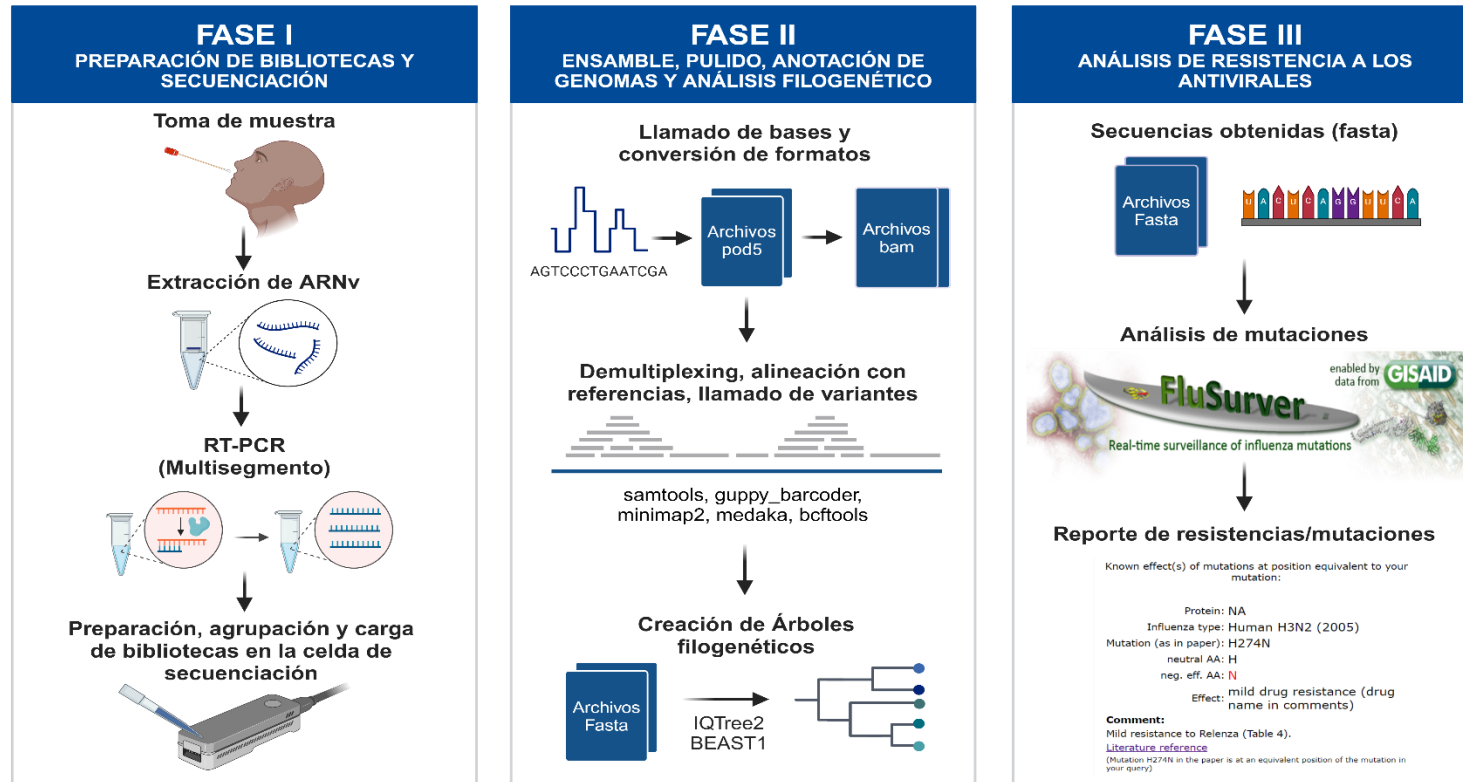


Figura 6. Diagrama experimental general.

**Fase I**, procesamiento de muestras a través de transcripción inversa de los ARN virales y la amplificación de los ocho segmentos utilizando cebadores específicos. Posteriormente, la preparación de bibliotecas para su secuenciación en la plataforma de Oxford Nanopore. **Fase II**, procesamiento de lecturas crudas mediante herramientas bioinformáticas para la obtención de las secuencias completas de cada segmento viral por muestra, permitiendo así la reconstrucción de la filogenia de cada uno. **Fase III**, análisis bioinformático para los segmentos de PA, HA y NA identificando mutaciones que podrían conferir resistencia a los antivirales, así como mutaciones epidemiológica o fenotípicamente relevantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de estudio

El diseño metodológico se clasifica como observacional, transversal, descriptivo, no ciego.

### Recolección de muestras

Se obtuvieron 50 muestras clínicas e información demográfica de pacientes que acudieron por atención médica a la Torre de Alta Especialidad y Medicina Avanzada del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El periodo de recolección fue del 2 de octubre de 2022 al 20 de mayo de 2023.

### Criterios

#### *Inclusión*

- Pacientes mayores de 18 años que en los últimos siete días hayan presentado al menos dos de los siguientes signos y síntomas: temperatura corporal  $>37^{\circ}\text{C}$ , tos o cefalea. Además, acompañado de al menos uno de los siguientes: disnea, artralgias, mialgias, odinofagia, rinorrea, conjuntivitis y dolor torácico.

#### *Exclusión*

- Pacientes que tengan más de siete días de evolución de los síntomas, con cuadros respiratorios recurrentes o con otra causa de infección aparente.
- Pacientes a los cuales no se les detecte ARN de Influenza A por medio de RT-qPCR.
- Personas menores a 18 años o en estado de gestación.

#### *Eliminación*

- Contaminación de las muestras.
- Muestra insuficiente.

### Selección de muestras

Se empleó la muestra de ARN que se utilizó para realizar el diagnóstico de Influenza A por medio de RT-qPCR con  $\text{CT} \leq 33$  a través del Kit *FLU-COVID RT-PCR* de Vitro Máster Diagnóstica (Ref. MAD-003942M-L, Vitro S.A).

### **Información demográfica**

Se obtuvo el consentimiento informado por parte de los pacientes y los siguientes datos clínicos:

- Edad
- Género
- Municipio de residencia
- Fecha de inicio de síntomas y toma de muestra

## FASE I: PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS Y SECUENCIACIÓN

### Extracción de ARN

La extracción del ARNv se realizó por medio del equipo Seegene NIMBUS IVD (No. Cat. 65415-03) con el kit de Extracción *Universal Cartridge Kit* (No. Cat. 744300.4. UC384), posteriormente, el ARN purificado se guardó en microtubos de 2 mL a -80°C hasta su procesamiento.

### RT-PCR multisegmento

- **Preparación de Mezcla de Cebadores Tuni – Influenza A**

Se preparó la mezcla de los cebadores Tuni 12, 12.4 y 13 específicos de influenza A (tabla 2), conforme a los volúmenes y concentraciones de la tabla 3.

Se reconstituyeron en agua libre de nucleasas, y se pusieron en un agitador automático para tubos de 1.5 mL por 10 min a 25°C para posteriormente almacenar los viales a -20°C.

**Tabla 2.** Cebadores específicos para virus de Influenza A.

COMPONENTE	SECUENCIA
Tuni 12	ACGCGTGATCAGCAAAGCAGG
Tuni 12.4	ACGCGTGATCAGCGAAAGCAGG
Tuni 13	ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG

**Tabla 3.** Mezcla de cebadores para Influenza A.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN
Agua	---	378µL
Tuni 12	100µm	16.8µL
Tuni 12.4	100µm	4.2µL
Tuni 13	100µm	21µL
<b>TOTAL</b>		420µL

- **Preparación de mezcla maestra RT-PCR influenza A**

Se preparo la mezcla maestra siguiendo los volúmenes de la tabla 4, en un tubo *Eppendorf* de 1.5mL de acuerdo con el número de reacciones.

**Tabla 4.** Mezcla maestra para RT-PCR de Influenza A.

COMPONENTE	X1	Concentración
Agua libre de nucleasas	11.6 µL	--
Mezcla de cebadores Influenza A	1.2 µL	0.5 µM
Reaction 2x Mix	14.8 µL	--
Enzimas SUPERSRIPT III RT/PLATINIUM TAQ Mix	1.2 µL	--
<b>Volumen total</b>	<b>28.8 µL</b>	<b>--</b>

Para la reacción de RT-PCR, se agregaron 28 µL de la mezcla maestra Influenza A y 2 µL de muestra de ARNv en tubos de PCR, posteriormente se centrifugó 5 segundos a 13,000 rpm, para colocarlos en el termociclador siguiendo el protocolo de incubación descrito en la tabla 5.

**Tabla 5.** Programa para RT-PCR Influenza A.

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Síntesis ADNc	42°C	60 min	1
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1
Desnaturalización  Alineamiento y extensión	94°C	30 segundos	5
	45°C 68°C	30 segundos 3 minutos	
Desnaturalización  Alineamiento y extensión	94°C	30 segundos	31
	57°C 68°C	30 segundos 3 minutos	



- **Purificación de amplicones de ADNc**

Se resuspendieron las partículas magnéticas por medio de mezcla en vortex y se dejaron a temperatura ambiente.

Una vez terminada la amplificación del ADNc viral, se transfirió el volumen total de la reacción (30µL) a tubos nuevos de 1.5 µL previamente rotulados, se añadió 50 µL del suspendido de las partículas magnéticas AMPure XP en cada tubo de muestra mezclando suavemente con la pipeta. Posteriormente, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.

Se prepararon 1000 µL de etanol fresco al 80% para los posteriores lavados. Una vez terminada la incubación de la muestra con las partículas magnéticas, se centrifugó brevemente por 5 segundos a 13,000 rpm, para continuar con la colocación de los tubos con la tapa abierta en el magneto de separación por 5 minutos. Una vez finalizado el tiempo, manteniendo los tubos en el magneto, se retiró el sobrenadante con una pipeta de 200 µL cuidando de no dispersar las partículas magnéticas. Se agregaron 200 µL de etanol fresco al 80% lentamente sobre la pared contraria a las partículas magnéticas para posteriormente retirarlo sin perturbar el conglomerado de partículas, este paso se realizó dos veces por muestra.

Una vez retirado el último lavado con etanol, se procedió con una centrifugación corta de 5 segundos a 13,000 rpm para posteriormente colocar los tubos de nuevo en el magneto por 30 segundos esto para retirar el etanol residual lentamente con una micropipeta de 10 µL.

Finalmente, se retiraron las muestras del magneto y agregó 15 µL de agua libre de nucleasas al conglomerado de partículas hasta la homogenización. Posteriormente se volvieron a colocar los tubos en el magneto por 2 minutos, para recuperar el aluato en tubos nuevos previamente rotulados, teniendo precaución de no tocar las partículas magnéticas.

- **Verificación de integridad del ADNc viral**

Para la verificación de integridad del ADNc, se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe. En cada pocillo se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de ADNc purificado; la corrida electroforética se realizó a 80V por 20 min para posteriormente aumentar a 90V por 1 hora.

Por otro lado, la cuantificación se realizó mediante fluorescencia en el equipo Qubit 3, usando 1  $\mu\text{L}$  de ADNc.

### **Ligación y preparación de la biblioteca**

- **Reparación de extremos**

Se determinó el volumen necesario para obtener 200 fmol de ADN por alícuota de muestra.

Se preparó la mezcla maestra de *End-Prep* en un tubo eppendorf de 1.5 mL, utilizando 15.75  $\mu\text{L}$  de Ultra II *End-Prep Reaction buffer* y 6.75  $\mu\text{L}$  de *Ultra II End-prep enzyme mix* para 9 reacciones.

Posteriormente, de la mezcla maestra se transfirieron 2.5  $\mu\text{L}$  para cada muestra del aforado de amplicones purificados, mezclando por pipeteo y después se centrifugaron brevemente. Por último, se incubó en termociclador, en primer ciclo a 20°C por 5 min y en segundo ciclo a 65°C por 5 min.

- **Ligación con Código de Barras Nativos (NBD)**

Se incubaron a temperatura ambiente los Códigos de barras y el Buffer de fragmentos cortos (SFB), usando un código por muestra. Además, se dejó en una gradilla refrigerada para su descongelación la *Ultra II Ligation Máster Mix*.

Se preparó una mezcla maestra para 9 reacciones utilizando 27 $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 45  $\mu\text{L}$  de Ultra II Ligation Máster Mix, de esta mezcla se colocaron 8  $\mu\text{L}$  en nuevos tubos previamente rotulados. Posteriormente, se agregaron 0.75  $\mu\text{L}$  de cada muestra end-Prep ADN y 1.25  $\mu\text{L}$  de los NBD mezclando por pipeteo.

Se colocó la reacción en el termociclador en un primer paso a 20°C por 20min, y en un segundo paso a 65°C por 10 min.

Se transfirieron todas las muestras en un solo tubo nuevo de 1.5 µL previamente rotulado, obteniendo un volumen final 90 µL, se añadió 0.4X de AMPure XP (36 µL) por volumen de la mezcla de reacciones mezclando suavemente con la pipeta. Posteriormente, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.

Se prepararon 500 µL de etanol fresco al 80% para los posteriores lavados. Una vez terminada la incubación de la muestra con las partículas magnéticas, se realizó una centrifugación breve de 5 segundos a 13,000 rpm, para continuar con la colocación de los tubos con la tapa abierta en el magneto de separación por 5 minutos. Una vez finalizado el tiempo, manteniendo los tubos en el magneto, se retiró el sobrenadante con una pipeta de 200 µL cuidando de no dispersar las partículas magnéticas.

Se lavaron las perlas con 700 µL de Short Fragment Buffer (SFB), retirando el tubo del magneto y resuspendiendo las perlas por medio de golpes suaves, posteriormente se regresó el tubo al magneto hasta la formación del conglomerado. Manteniendo el tubo en el magneto se removió el sobrenadante, evitando la dispersión de las partículas, para posteriormente repetir el paso de lavado con SFB.

Después de retirar por segunda vez el SFB, manteniendo el tubo aun en el magneto se procedió a realizar un lavado con etanol fresco al 80% lentamente sobre la pared contraria a las partículas magnéticas para posteriormente retirarlo sin perturbar el conglomerado de partículas.

Una vez retirado el etanol, se procedió con una centrifugación corta de 5 segundos a 13,000 rpm para posteriormente colocar el tubo en el magneto por 30 segundos esto para retirar el etanol residual lentamente con una micropipeta de 10 µL.

Finalmente, se retiró el tubo del magneto y agregó 35  $\mu$ L de agua libre de nucleasas al conglomerado de partículas hasta la homogenización, para volver a colocar el tubo en el magneto por 2 minutos, se recuperó finalmente el aluato en un tubo nuevo previamente rotulado, teniendo precaución de no tocar las partículas magnéticas.

- **Ligación con Adaptadores**

Se colocaron a temperatura ambiente el EB y el SFB después de mezclar por vortex y centrifugación corta. A su vez, se dejó descongelar en gradilla fría el Adapter Mix II (AMII) y la enzima Quick T4 DNA Ligase.

Se procedió a realizar la ligación en un tubo nuevo de 1.5 mL, añadiendo 30  $\mu$ L de la muestra unida a los códigos de barras, 5  $\mu$ L de AMII, 10  $\mu$ L de NEBNext Quick ligation Reaction Buffer (5X), 5  $\mu$ L de Quick T4 DNA Ligase, esto mezclado por pipeteo, para posteriormente someterlo a centrifugación corta (5 seg a 13,000rpm) y una incubación por 10 min a temperatura ambiente.

Posterior a la incubación, se purificó con partículas magnéticas AMPure XP, añadiendo 20  $\mu$ L de estas en el tubo de reacción, después se incubó en rotación por 10 min. después de esto, se le dio una centrifugación corta y se colocó en el magneto por 5 min para retirar el sobrenadante.

Se lavó el conglomerado de perlas con 125  $\mu$ L de SFB retirándolo del magneto y resuspendiendo por medio de golpes suaves, posteriormente se regresó al magneto y se descartó el sobrenadante una vez que este estuviera decolorado y limpio, este paso se repitió dos veces.

Una vez retirado el sobrenadante, se procedió a una centrifugación corta y se colocó de nuevo en el magneto por 30 segundos para después retirar el sobrenadante residual. Se retiró el tubo de reacción del magneto y se resuspendieron las partículas con 15  $\mu$ L de Buffer de elución (EB), posteriormente se centrifugó por 5 segundos y se puso en el magneto por 1min, para recuperar el eluido y colocarlo en un tubo nuevo de 1.5 ml previamente rotulado.

- **Purga y carga de la celda de flujo SpotON**

Se descongelaron los reactivos a temperatura ambiente: SQB (Buffer de secuenciación), LB (Perlas de carga), FLT (Flush Tether) y un tubo de FB (buffer de descarga).

Para la preparación de la mezcla de purga, se añadió 30  $\mu\text{L}$  de FLT directamente en el tubo de FB mezclando por pipeteo.

Se abrió la tapa del MinION y se deslizó la celda de flujo debajo del clip. Se abrió la puerta de cebado de la celda de flujo en el sentido de las manecillas del reloj, siempre asegurando que no se elimine más de 20-30  $\mu\text{L}$  y verificando que la matriz de poros siempre está cubierta por el buffer en todo momento, ya que la introducción de burbujas de aire puede dañar la matriz de forma irreversible.

Posterior a la apertura de la puerta de cebado, se colocó la punta de la puntilla de una pipeta de 1000  $\mu\text{L}$  para extraer de 20-30  $\mu\text{L}$  del buffer, verificando siempre que visualmente haya buffer continuo desde el puerto de cebado hasta la matriz de sensores.

Se cargó 800  $\mu\text{L}$  de mezcla de cebado (FLT-FB) en la celda de flujo a través de la celda de cebado, evitando la introducción de burbujas de aire, dejando incubar el líquido cerca de 5 min.

Se procedió a preparar la biblioteca para su carga, homogeneizando previamente las LB, y agregando en un tubo nuevo 37.5  $\mu\text{L}$  de SQB, 25.5  $\mu\text{L}$  de LB y 12  $\mu\text{L}$  de la biblioteca mezclando por pipeteo.

Para completar el cebado, se levantó con cuidado la cubierta del puerto de muestra SpotON para su accesibilidad, posteriormente se cargó 200  $\mu\text{L}$  de mezcla de cebado en el puerto de cebado (no en puerta de muestra) evitando la introducción de burbujas. Se mezcló suavemente la biblioteca preparada justo antes de la carga, se agregó 75  $\mu\text{L}$  de la biblioteca preparada en la celda a través del puerto de muestra SpotON gota a gota, asegurando que cada gota fluya hacia el puerto antes de agregar la siguiente.

Se coló de nuevo la tapa del puerto de muestra, teniendo en cuenta que el buffer entre en el puerto SpotON, por último, se cerró el puerto de cebado y se colocó la tapa del dispositivo MinON.

Para finalizar, se conectó el dispositivo MinON a la computadora donde se ejecutó y se hizo las configuraciones requeridas en el sistema MinKNOW.

### **Secuenciación**

En el sistema MinKNOW, se configuró para una secuenciación de 8 horas, con los ajustes estándar para el *Flujo de Trabajo* de virus de Influenza A.

## **FASE II: ENSAMBLE, PULIDO, ANOTACIÓN DE GENOMAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO**

### **Ensamble por referencia**

Finalizada la etapa de secuenciación, se obtuvieron los archivos de lecturas crudas en formato Fast5. Los cuales se convirtieron al formato Pod5 y posteriormente se realizó el llamado de bases (*Basecalling*) por medio de la herramienta Dorado, obteniendo archivos de salida *.bam*.

Después, a través de samtools fastQ se convirtieron a archivos FastQ, continuando con el *Demultiplexing* con guppy\_barcode.

Posterior a esto, se realizó un alineamiento de las lecturas con genomas de referencia descargados (Anexo 1) de *NCBI virus* utilizando minimap2.

Finalmente, se creó una secuencia consenso y selección de variantes con las herramientas medaka y bcftools, así realizar un enmascaramiento en áreas con baja profundidad, lo que da como resultado las secuencias en formato *.fasta*.

La línea de comandos para el ensamble por referencia está en el anexo 2.

### **Pulido de secuencias**

Una vez obtenidos los formatos *.fasta* de las secuencias obtenidas en el proceso anterior, se procedieron a revisarlos en el programa *NCBI Influenza Virus*

*Sequence Annotation Tool*, para conocer si existían errores en el marco de lectura, inserciones o deleciones en las secuencias.

Si ocurrían estos eventos en las secuencias, se procedió a revisar manualmente el alineamiento de las lecturas en el programa *Tablet*, buscando en el sitio del error cambios en los nucleótidos reportados en las secuencias consenso creada anteriormente. Una vez identificado el o los errores en la secuencia, se curó manualmente y se verificó si el error se resolvió con la misma herramienta.

### **Anotación de genomas virales**

Una vez obtenidos los segmentos virales pulidos, se utilizó la herramienta de *NCBI Influenza Virus Sequence Annotation Tool*. En esta plataforma web, se introdujo el archivo *.fasta* para su procesamiento bioinformático, posterior a esto se obtuvieron las tablas de características y los archivos *.gbf* que se puede utilizar para enviar secuencias a GenBank.

### **Reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud y Credibilidad de Clado del virus de Influenza A**

Para la reconstrucción de la filogenia de las secuencias obtenidas se realizó lo siguiente, primeramente, se realizó una búsqueda de secuencias similares en la herramienta *Influenza Virus Resource* de *NCBI Virus*, tomando en consideración los siguiente:

- Tipo A, subtipos H3N2, H1N1pdm09, H1N1.
- Hospedero: humano.
- Región geográfica: cualquiera.
- Segmentos virales: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M y NS
- Temporalidad: 02 de octubre de 2022 al 20 mayo de 2023.

De esta búsqueda de secuencias se excluyeron aquellas provenientes de cultivo, secuencias vacunales y subtipos mezclados. Se incluyeron secuencias del Proyecto FLU, así como virus pandémicos.

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple con el programa *mafft*. Para después hacer un retiro de los extremos irregulares de las secuencias e iniciar

con la construcción de árboles de Máxima Verosimilitud para todos los segmentos virales usando el programa IQTree 2. Se utilizó además la herramienta *ModelFinder* para predecir el modelo de sustitución más adecuado para la construcción filogenética.

Después se exploró el árbol por medio de la herramienta Tempest, para corroborar la temporalidad.

Finalmente se crearon arboles de Máxima Credibilidad de Clado solo para los segmentos de superficie: hemaglutinina (segmento 4) y neuraminidasa (segmento 6), utilizando el programa BEAST 1. Para ello, se preparó el archivo .xml con el programa beauti, utilizando los parámetros obtenidos anteriormente (método de sustitución), se procedió a la inferencia bayesiana, para finalmente visualizar los archivos de salida .log en Tracer corroborando los ESS (Tamaño de Muestra Efectiva, por sus siglas en inglés). El ESS es el parámetro del número de extracciones efectivas independientes de la distribución posterior al que equivale la cadena de Markov. Finalmente se visualizó el archivo .tree con figtree para realizar la representación gráfica de cada uno de los árboles.

### **FASE III: ANÁLISIS DE RESISTENCIA A LOS ANTIVIRALES**

Una vez obtenidas las secuencias de los segmentos virales de la PA, HA y NA, se procedió al procesamiento en el programa web Flusurver. Este programa hace una búsqueda en dichas secuencias de mutaciones candidatas epidemiológica o fenotípicamente relevantes. La búsqueda se realiza de acuerdo con la base de datos del Sistema Global de Vigilancia y Respuesta ante la Influenza (GISAID). Estas mutaciones se basan en secuencias de referencia curadas de cepas que infectaron humanos recientemente.



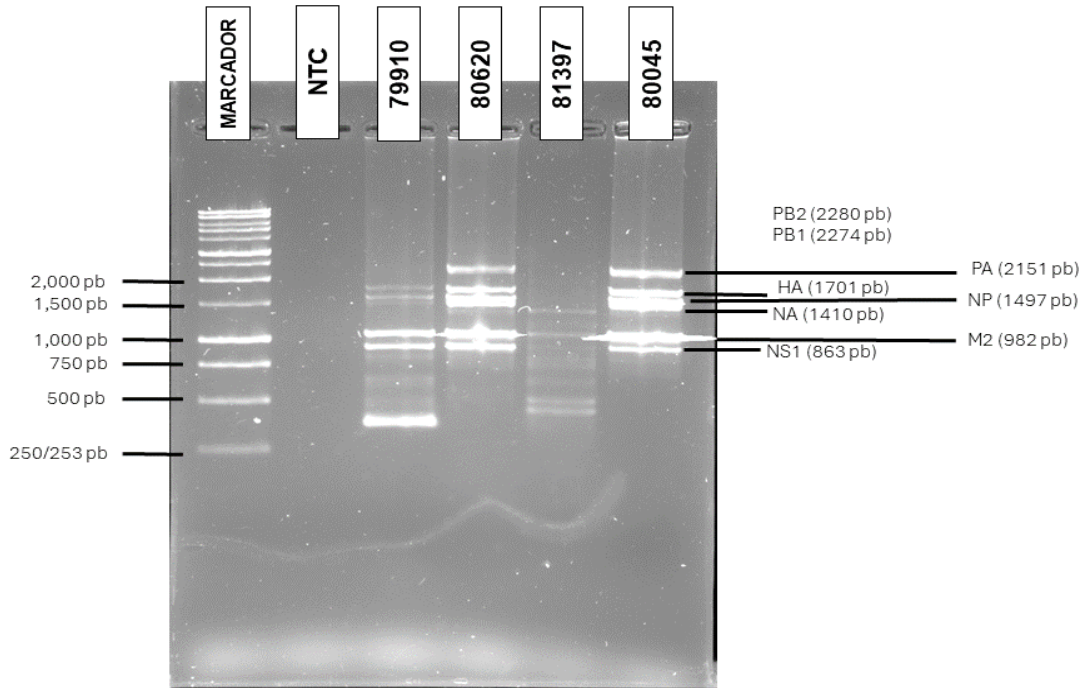
## RESULTADOS

### Quantificación y verificación de patrón de bandas de amplicones.

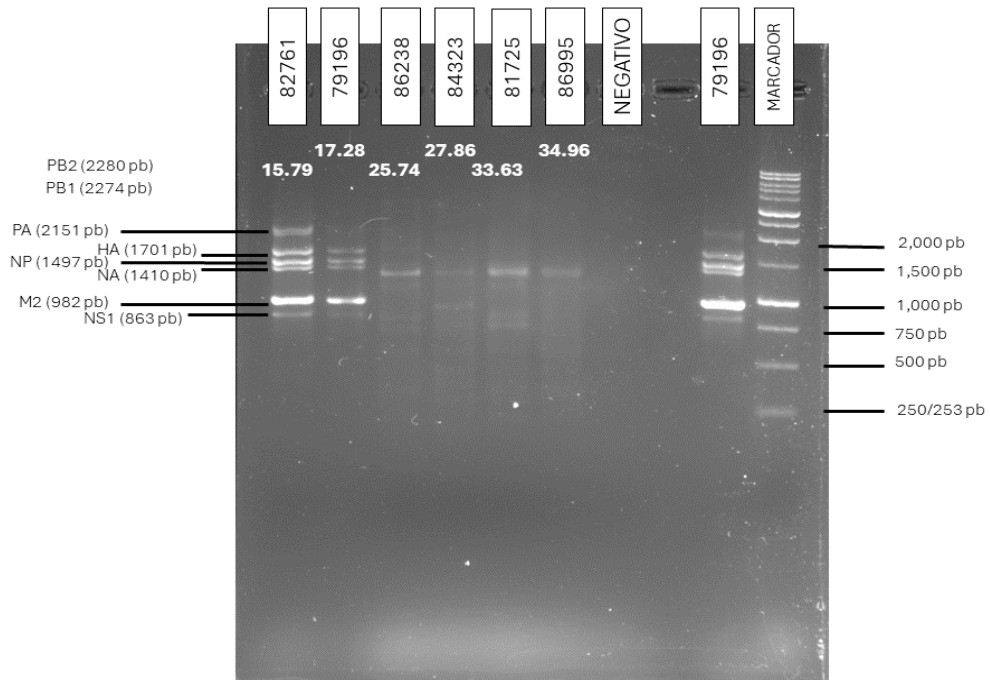
Se obtuvieron un total de 50 muestras del Servicio de Infectología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", de las cuales solo se tomaron 18 para su procesamiento. Se utilizó el ARNv previamente extraído para continuar con la RT-PCR, tomando como criterio solo una CT  $\leq 25$ . A partir de estas muestras procesadas, se obtuvieron las siguientes concentraciones de amplicones de ADNc de todo el genoma viral.

**Tabla 6.** Cuantificación de amplicones de genoma completo de virus de Influenza A.

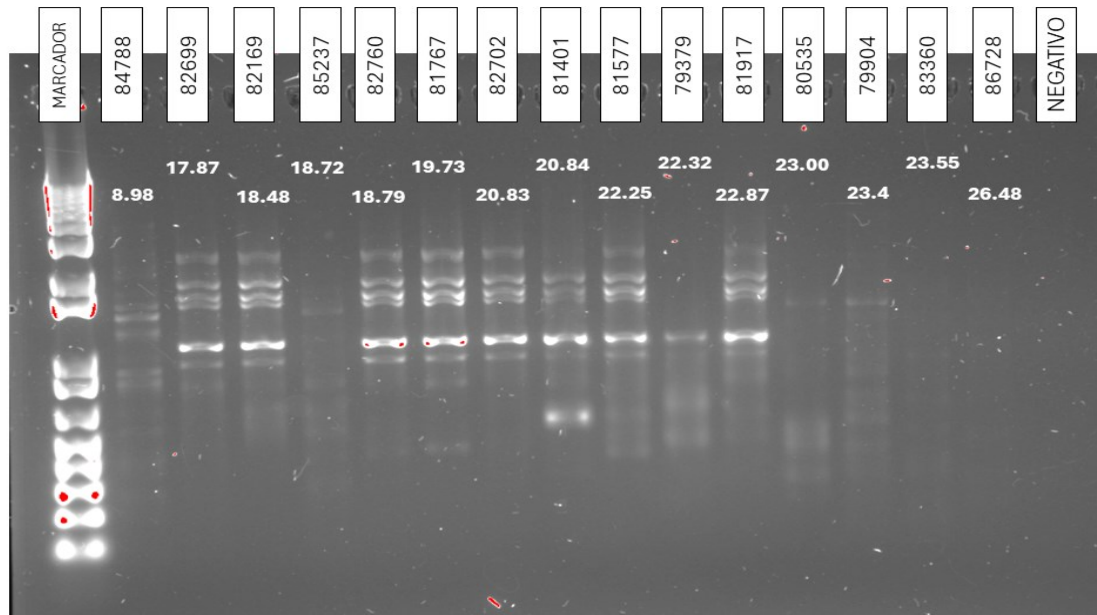
ID CONTINUO	ID MUESTRA	CONCENTRACION (ng/ $\mu$ L)
1	81567	24.8
2	81570	62.2
3	81576	30
4	81578	25
5	79910	87.6
6	80045	751.47
7	80620	112
8	81397	28.2
9	82761	61.2
10	79196	18.6
16	82699	35.6
17	82169	59
19	82760	58.6
20	81767	57.6
21	82702	45.8
22	81401	49
23	81577	47.6
25	81917	44.4



**Figura 7.** Gel 1: Patrón de bandas correspondientes a los segmentos virales. Condiciones de electroforesis: 1.3 % agarosa, 85 V por 1h 30min.



**Figura 8.** Gel 2: Patrón de bandas correspondientes a los segmentos virales. Condiciones de electroforesis: 1.3 % agarosa, 85 V por 1h 30min.



**Figura 9.** Gel 3: Patrón de bandas correspondientes a los segmentos virales. Condiciones de electroforesis: 1.3 % agarosa, 85 V por 1h 30min.

Se realizaron tres electroforesis en gel de agarosa, para obtener los patrones de bandas características. En los geles 1 y 2, se probaron 10 muestras para estandarización de condiciones de resolución de los segmentos, con base en sus pesos moleculares, obteniéndose las condiciones de 1.3% de agarosa a 1 hora y 30 min, donde se logran ver cerca de 6 a 7 segmentos virales (863 – 2151 pb).

Para el gel 3, con las condiciones ya mencionadas, se probaron 15 muestras para visualizar los segmentos virales amplificados. Se tomaron como criterio las muestras con  $CT \leq 25$  para proponer un punto de corte basado en CT previamente reportado. También se evaluó cualitativamente qué muestras pasaban el control de calidad. Se utilizó como criterio el patrón de bandas características para su posterior secuenciación. Aquellas muestras con un número igual o mayor a 6 bandas fueron seleccionadas para su secuenciación.

Una vez seleccionadas las muestras con buen patrón de bandas en la electroforesis en gel, se procedió la preparación de la biblioteca para su secuenciación en la celda de flujo como se describe en la metodología. Se

cuantificaron las bibliotecas posteriores a la ligación con códigos de barras y adaptadores, obteniéndose las concentraciones de la tabla 7.

**Tabla 7.** Concentraciones de las bibliotecas previas a secuenciación.

<b>ID DE CORRIDA DE SECUENCIACIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN (ng/μL)</b>
INFLUENZA_A_1	10.4
INFA-25092023-10	16.3

### Lecturas de muestras secuenciadas

Posterior a la llamada de bases y filtrar las lecturas crudas, se obtuvieron las lecturas con una QS  $\geq 8$ , las lecturas con menor QS fueron clasificadas como fallidas.

**Tabla 8.** Lecturas con QS $\geq 8$  por código de barras.

ID CONTINUO	ID MUESTRA	CÓDIGO DE BARRAS	LECTURAS
1	81567	42	4696
2	81570	54	3666
3	81576	66	8609
4	81578	78	13221
5	79910	90	4436
6	80045	7	2058
7	80620	19	8774
8	81397	31	23875
9	82761	69	1075
10	79196	9	4087
16	82699	92	3441
17	82169	80	7139
19	82760	56	15232
20	81767	68	4588
21	82702	21	4358
22	81401	57	2125
23	81577	45	2212
25	81917	33	2599

### Subtipificación viral de las secuencias obtenidas

Una vez procesadas las lecturas por medio de las diferentes herramientas bioinformáticas, se lograron identificar 15 de las 18 muestras secuenciadas, tres de las 18 fueron descartadas debido a mala calidad en las lecturas de los segmentos de HA y NA, cruciales para su subtipificación.

Los subtipos se describen en la tabla 9, donde el 94% fueron H3N2 y el 6% fue H1N1.

**Tabla 9.** Subtipos virales de las muestras secuenciadas.

ID CONTINUO	ID MUESTRA	SUBTIPO VIRAL
1	81567	No identificada
2	81570	H1N1
3	81576	No identificada
4	81578	H3N2
5	79910	H3N2
6	80045	H3N2
7	80620	H3N2
8	81397	No identificada
9	82761	H3N2
10	79196	H3N2
16	82699	H3N2
17	82169	H3N2
19	82760	H3N2
20	81767	H3N2
21	82702	H3N2
22	81401	H3N2
23	81577	H3N2
25	81917	H3N2

### **Análisis filogenético**

Se realizó la reconstrucción de la filogenia para los 6 segmentos internos (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) por máxima verosimilitud con 1,000 réplicas de arranque y el modelo GTR+I+G, utilizando las secuencias descargadas de la plataforma de NCBI Influenza Virus.

Para los 2 segmentos de superficie (HA y NA), se construyeron árboles de Máxima Credibilidad de Clado por medio de BEAST1, con los parámetros:

- **Modelo de sustitución:** HKY (*H3N2*) y GTR+F+G4 (*H1N1pdm09*)
- **Reloj:** Estricto
- **Coalescencia:** Crecimiento Exponencial
- **Cadenas:** 100,000,000

## **1. PB2 (Polimerasa Básica 2)**

Para el segmento de la Polimerasa básica 2, en el subtipo H3N2 (figura 10), se observó la agrupación de las secuencias en tres clados claramente diferenciados. La mayoría fue agrupada en tres subconjuntos con muestras recolectadas en Estados Unidos, con probabilidades posteriores de 76.5, 84.9, 87.1 y 91.3. Por otro lado, solo una muestra fue asignada de forma independiente en otro subconjunto. Este subconjunto incluyó secuencias reportadas para Reino Unido y Estados Unidos con una probabilidad posterior de 76.3.

Para la única muestra de H1N1pdm09 (figura 11), esta fue agrupada con muestras reportadas para el suroeste de los Estados Unidos (California y Nuevo México) entre 13 de diciembre de 2022 al 29 de marzo de 2023, con una probabilidad posterior de 93.5.

Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.1.



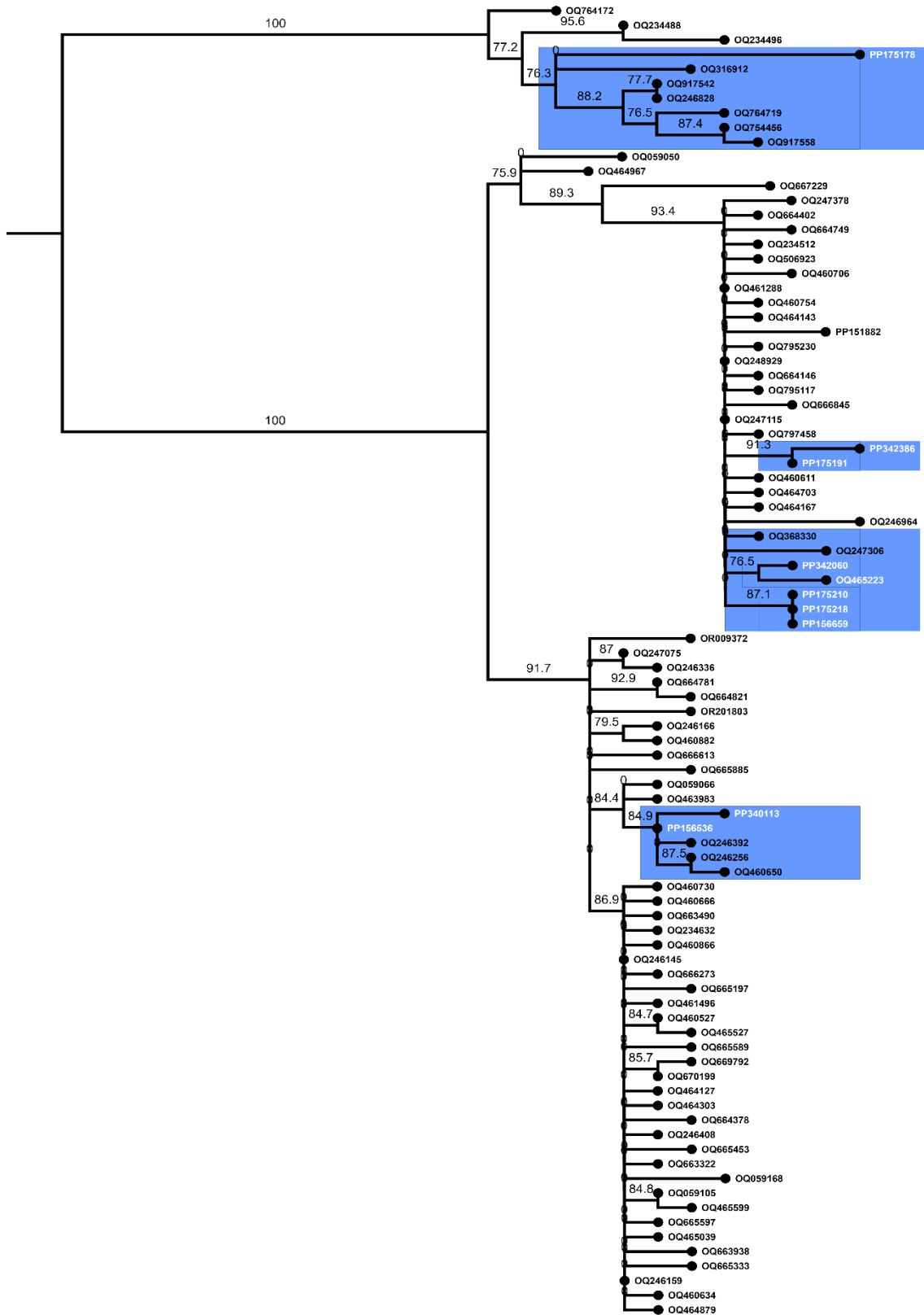
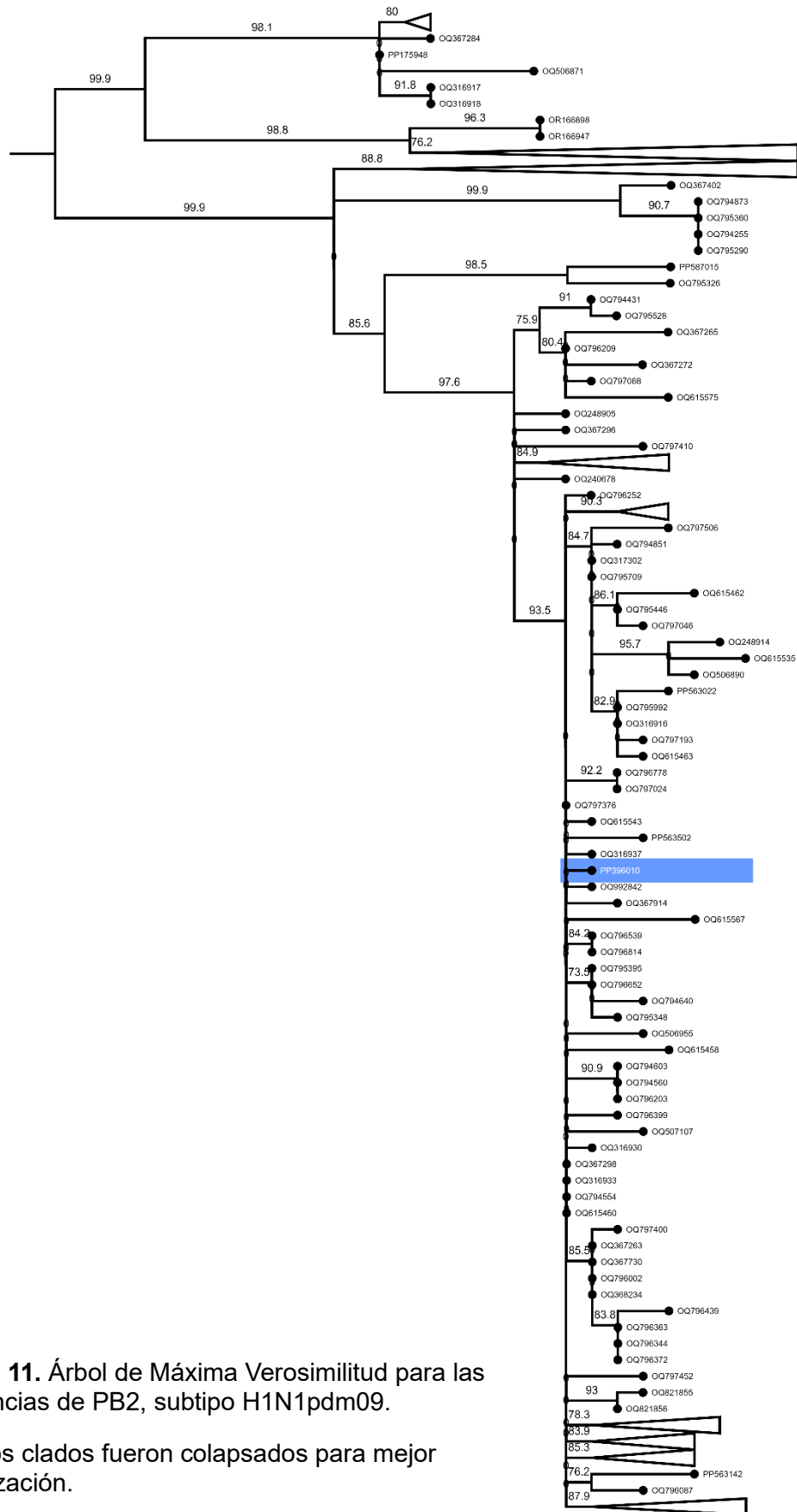


Figura 10. Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB2, subtipo H3N2.



**Figura 11.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB2, subtipo H1N1pdm09.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.

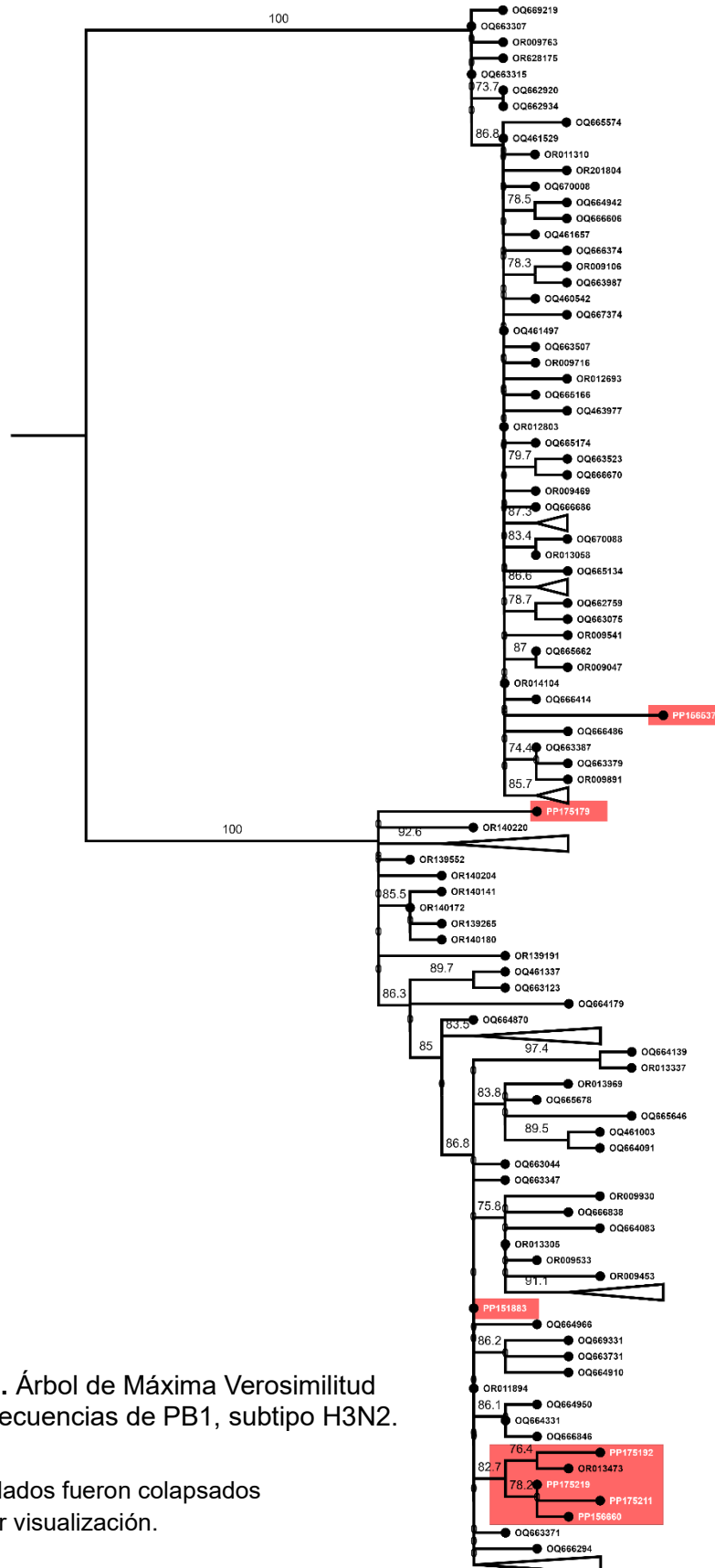
## 2. PB1 (Polimerasa Básica 1)

Las secuencias del segmento 2, correspondiente a la Polimerasa Básica 1 del subtipo H3N2 (figura 12), se agruparon en tres clados diferentes. Cuatro secuencias formaron un clado monofilético, agrupando una secuencia reportada en Texas, EUA, en enero de 2023, con una probabilidad posterior de 82.7. Por otro lado, tres secuencias fueron agrupadas de forma independiente en los otros dos clados.

La secuencia *PP151883* se agrupó con muestras reportadas del centro-este de Estados Unidos (Montana, Colorado, Florida y Kentucky) entre el 12 de diciembre de 2022 y el 16 de enero de 2023, con una probabilidad de 86.8. La secuencia *PP175179* se agrupó con secuencias reportadas en Nicaragua desde junio - julio de 2022. Finalmente, la secuencia *PP156537* fue agrupada con otras reportadas para el este de Estados Unidos (New Jersey, Florida, Maine y Connecticut) desde el 4 de diciembre de 2022 al 18 de enero de 2023, con una probabilidad posterior de 86.8.

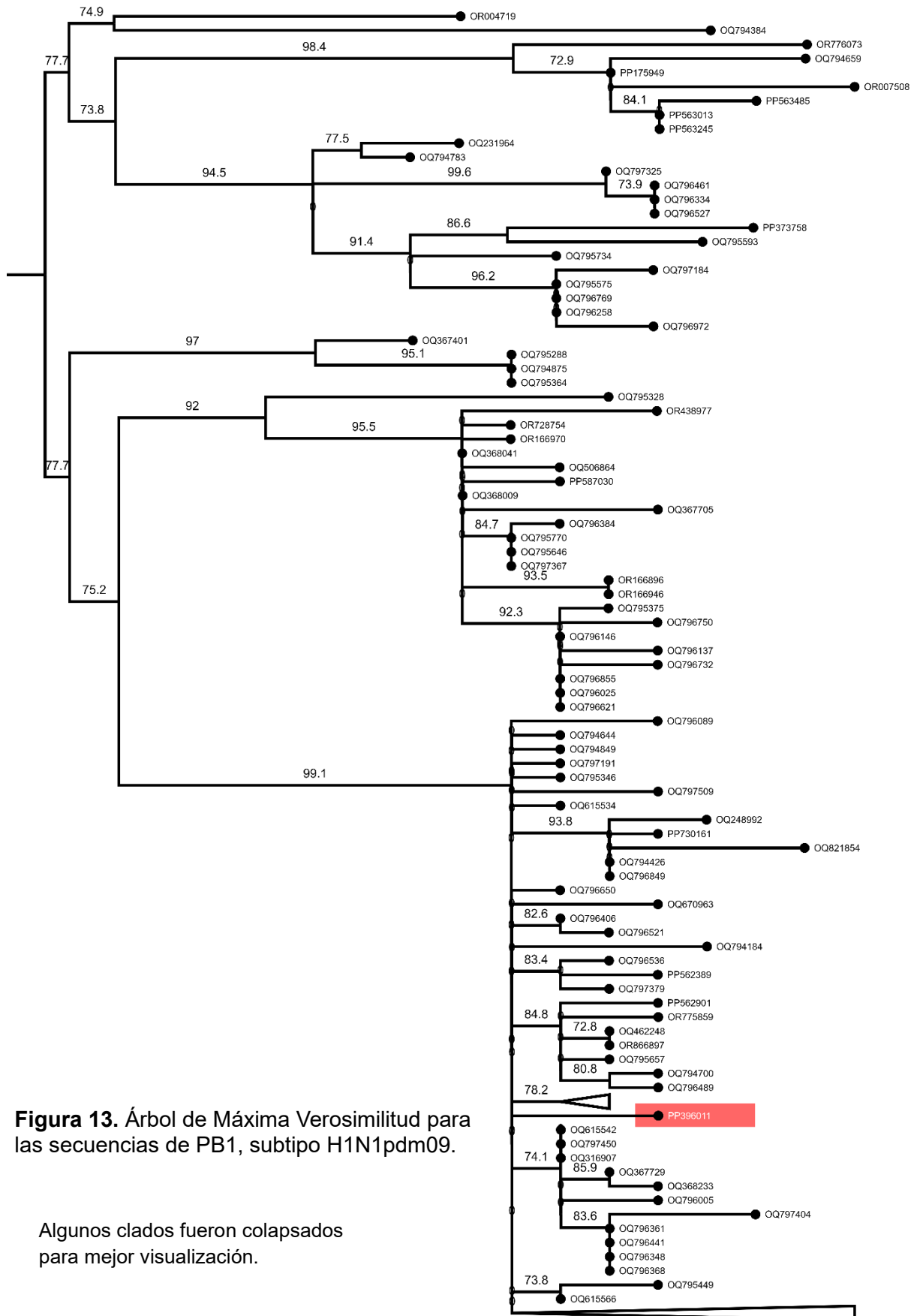
La secuencia *PP396011*, correspondiente al subtipo H1N1pdm09 (figura 13), se agrupó en un clado con secuencias reportadas del sureste de Estados Unidos (Missouri y Georgia) entre el 1 de diciembre de 2022 y el 9 de febrero de 2023, con una probabilidad posterior de 99.1.

Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.2.



**Figura 12.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB1, subtipo H3N2.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.



**Figura 13.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PB1, subtipo H1N1pdm09.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.

### **3. PA (Polimerasa Ácida)**

Las secuencias de los aislados del subtipo H3N2 (figura 14) fueron distribuidas en tres clados. Diez secuencias fueron agrupadas en cuatro subconjuntos, con probabilidades posteriores de 80.5, 85.1, 90.2 y 93. Estas muestras fueron tomadas en el suroeste de Estados Unidos (Colorado y Arizona) entre el 26 de noviembre de 2022 y enero de 2023. Por otro lado, solo una secuencia se agrupó independientemente con muestras provenientes de Nicaragua y Tennessee, EUA, entre junio y diciembre de 2022.

Para la única secuencia de H1N1pdm09, con número de acceso PP396012 (figura 15), fue agrupada con una probabilidad posterior de 75.9. Esta agrupación incluyó secuencias reportadas en el sureste de Estados Unidos en diciembre de 2022 y en Alemania entre el 29 de enero y el 2 de febrero de 2023.

Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.3.



**Figura 14.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PA, subtipo H3N2.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.



**Figura 15.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de PA, subtipo H1N1pdm09.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.



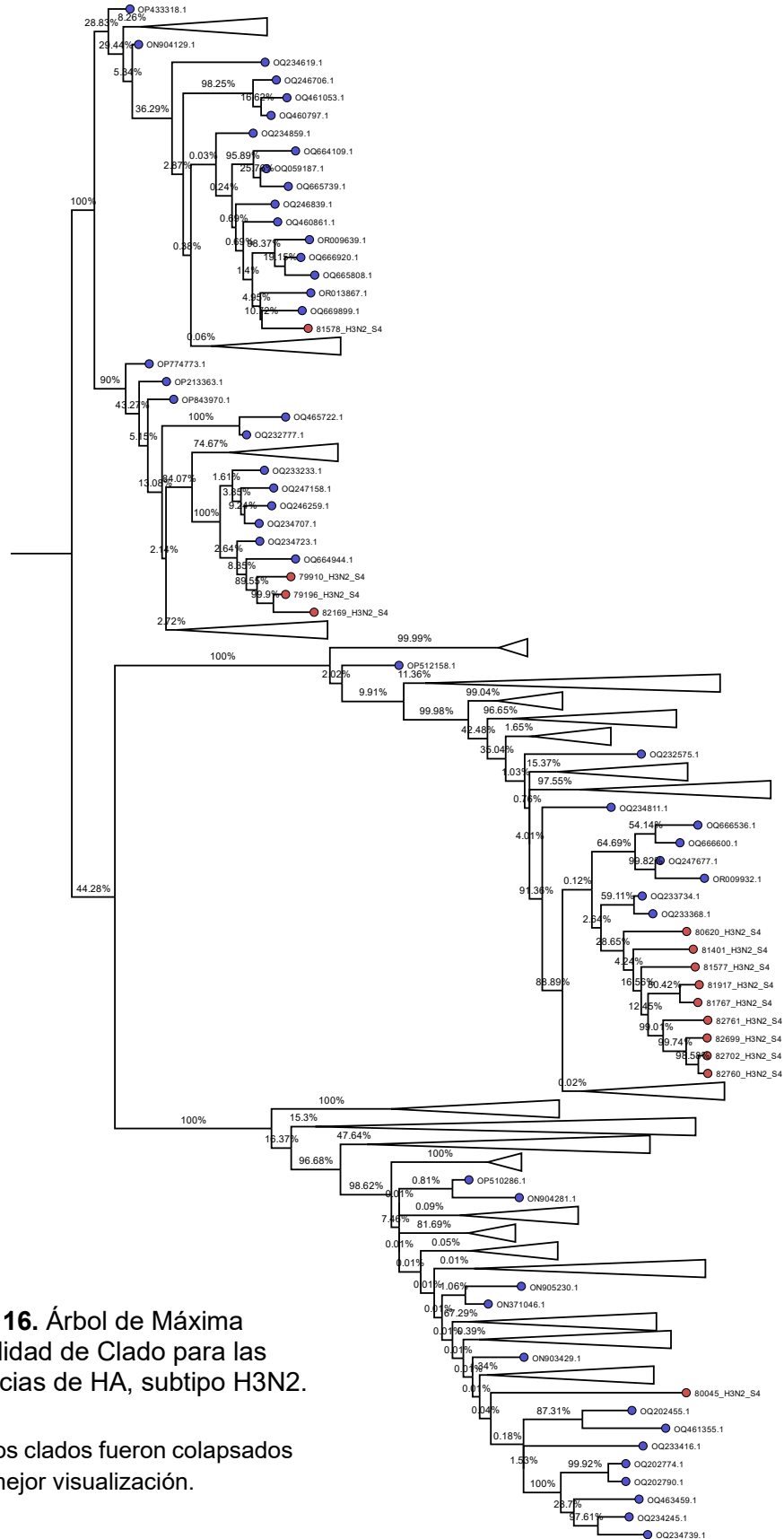
#### **4. HA (Hemagglutinina)**

Para las secuencias del subtipo H3N2 (Figura 16), se encontró que 9 muestras fueron agrupadas en un clado monofilético mexicano con una probabilidad posterior de 28.65. Por otro lado, 3 muestras se agruparon en otro clado con una probabilidad de 89.55. Esta agrupación incluyó una secuencia reportada de Colorado, EUA, del 11 de diciembre de 2022.

Finalmente, solo 2 muestras fueron agrupadas en dos clados lejanos con una probabilidad posterior de 0.04 y 10.72. Estas muestras se agruparon tanto con secuencias del noroeste como del noreste de los Estados Unidos, respectivamente, entre septiembre y diciembre de 2022.

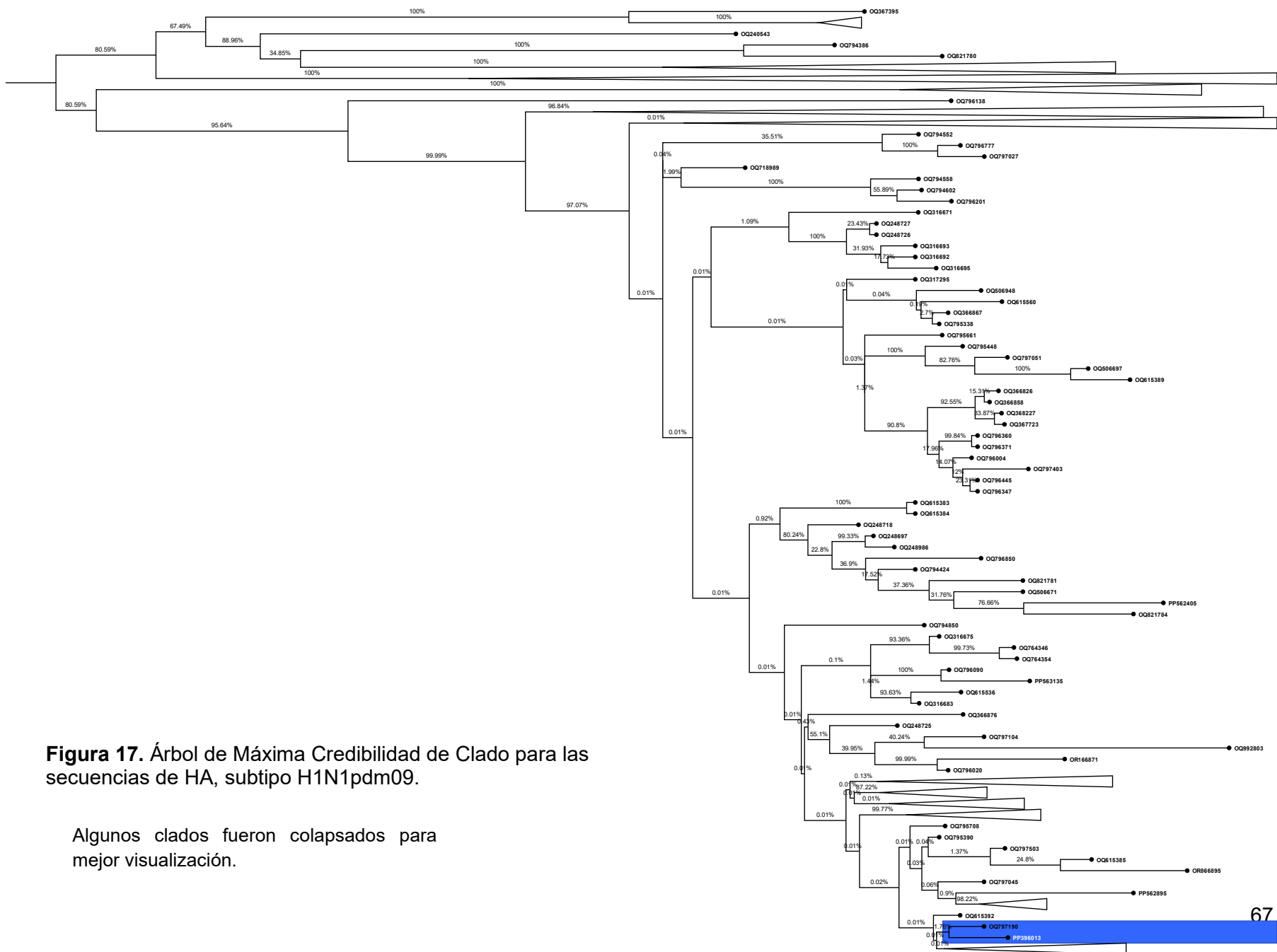
El único aislado del subtipo A H1N1pdm09 (Figura 17) se agrupó con una probabilidad posterior de 1.76. Esta agrupación incluyó una secuencia reportada de Estados Unidos el 21 de diciembre de 2022. Esta secuencia fue reportada por el CEIRR Influenza Data Processing and Communication Center (IDPCC). El IDPCC es un centro de concentración de muestras enviadas de varias regiones de Estados Unidos.

Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.4.



**Figura 16.** Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de HA, subtipo H3N2.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.



**Figura 17.** Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de HA, subtipo H1N1pdm09.

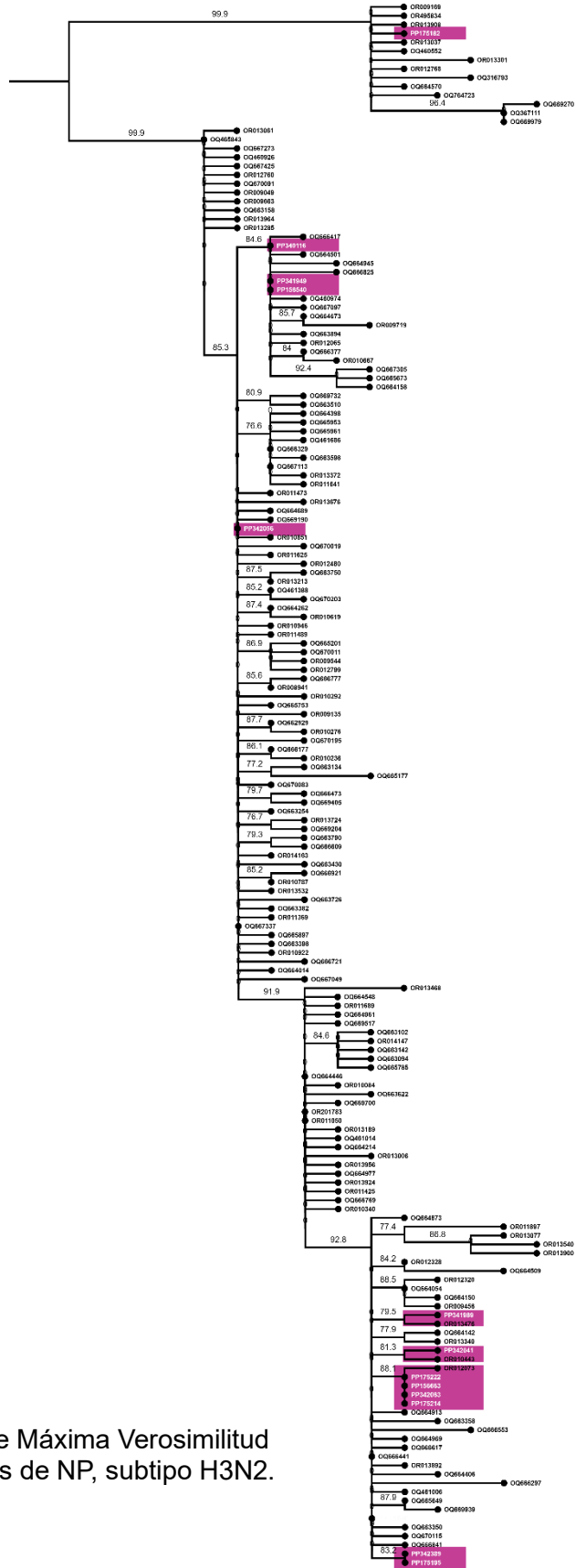
Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.

## 5. NP (Nucleoproteína)

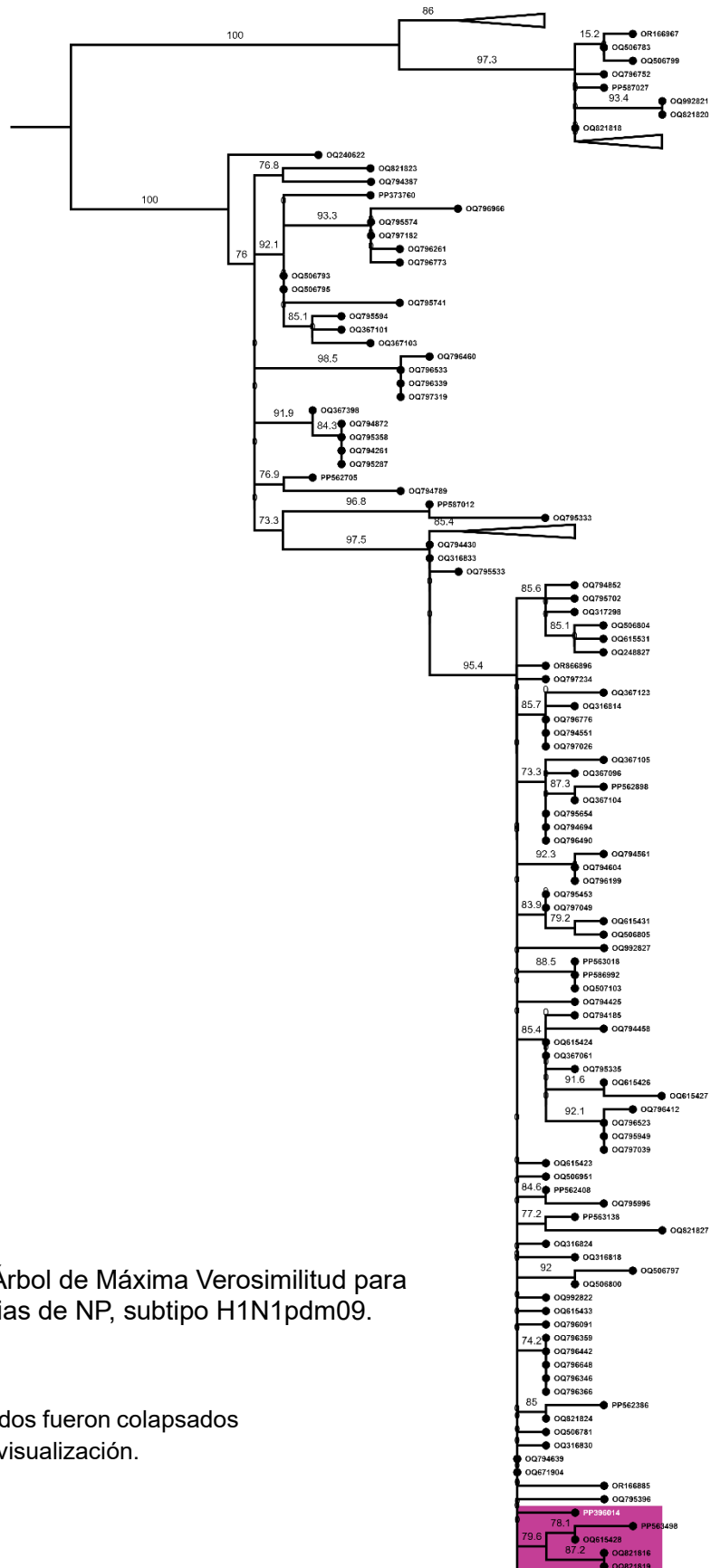
Las secuencias de los aislados del subtipo H3N2 (Figura 18) se agruparon en tres clados. Ocho secuencias se distribuyeron en tres subconjuntos con probabilidades posteriores de 79.5, 81.3, 83.2 y 88.1. Estas secuencias fueron reportadas en Nevada, Oregón, Idaho, Hawái y Texas, Estados Unidos, entre diciembre de 2022 y enero de 2023. Por otro lado, cuatro secuencias se agruparon con una probabilidad posterior de 85.3. Estas muestras provinieron del noreste (Nevada, Oregón y Colorado) y noroeste (South Dakota y Vermont) de los Estados Unidos, entre noviembre de 2022 y enero de 2023. Finalmente, una secuencia (PP175182) se agrupó con una probabilidad posterior de 99.99. Esta agrupación incluyó muestras reportadas del este de los Estados Unidos (Delaware, Florida, Michigan y Washington).

Para la secuencia del subtipo H1N1pdm09 con número de acceso PP396014 (Figura 19), se agruparon con secuencias reportadas del sur de Estados Unidos entre el 28 de noviembre de 2022 y el 17 de enero de 2023, con una probabilidad posterior de 95.4.

Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.5.



**Figura 18.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NP, subtipo H3N2.



**Figura 19.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NP, subtipo H1N1pdm09.

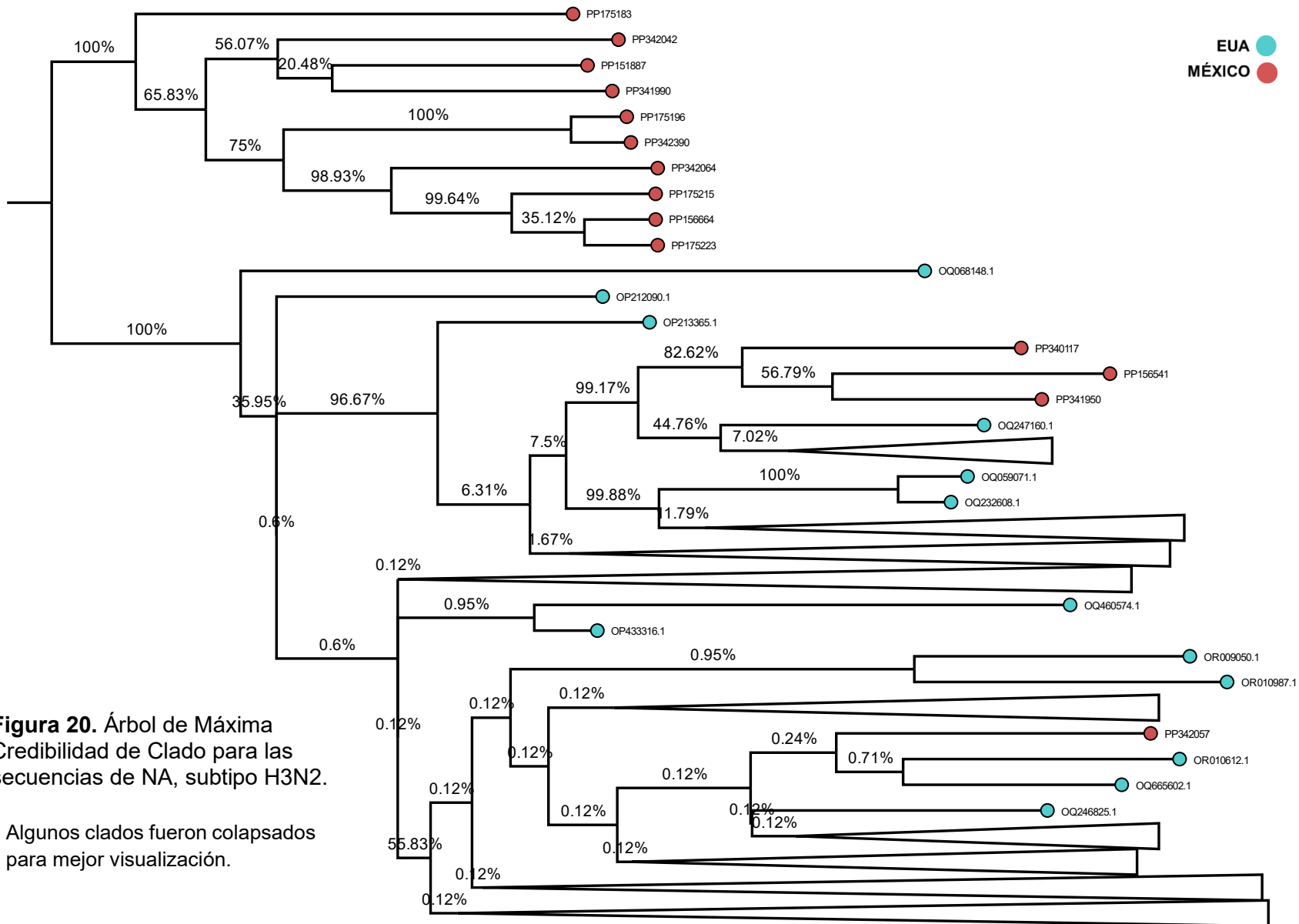
Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.

## **6. NA (Neuraminidasa)**

Las secuencias del subtipo H3N2 obtenidas en este trabajo (Figura 20) se agruparon en dos clados diferentes. Diez secuencias formaron un clado monofilético mexicano con una probabilidad posterior de 100. Por otro lado, cuatro muestras se agruparon en dos subconjuntos con probabilidades posteriores de 0.12 y 82.62. Estas secuencias fueron reportadas en Arizona, Colorado, Idaho, Georgia y Montana, en los Estados Unidos, entre el 5 de noviembre de 2022 y el 12 de enero de 2023.

Para la única secuencia de H1N1pdm09 (Figura 21), esta se agrupó en un subclado con una probabilidad de 8.74. Esta agrupación incluyó secuencias reportadas en Alemania entre el 29 de enero y el 2 de febrero de 2023.

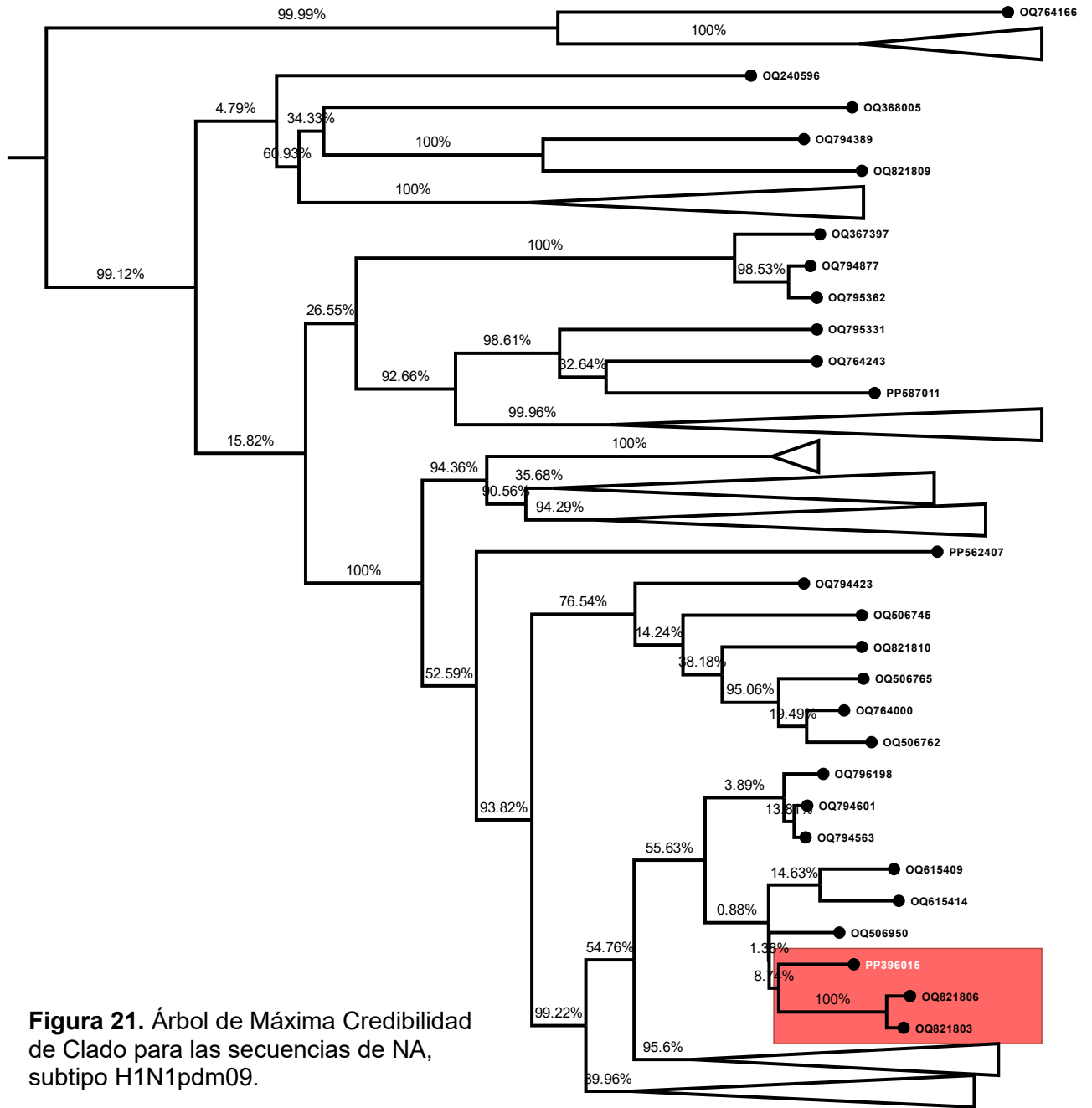
Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.6.



**Figura 20.** Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de NA, subtipo H3N2.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.





**Figura 21.** Árbol de Máxima Credibilidad de Clado para las secuencias de NA, subtipo H1N1pdm09.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.

## **7. M (Proteína de Matriz 1 y 2)**

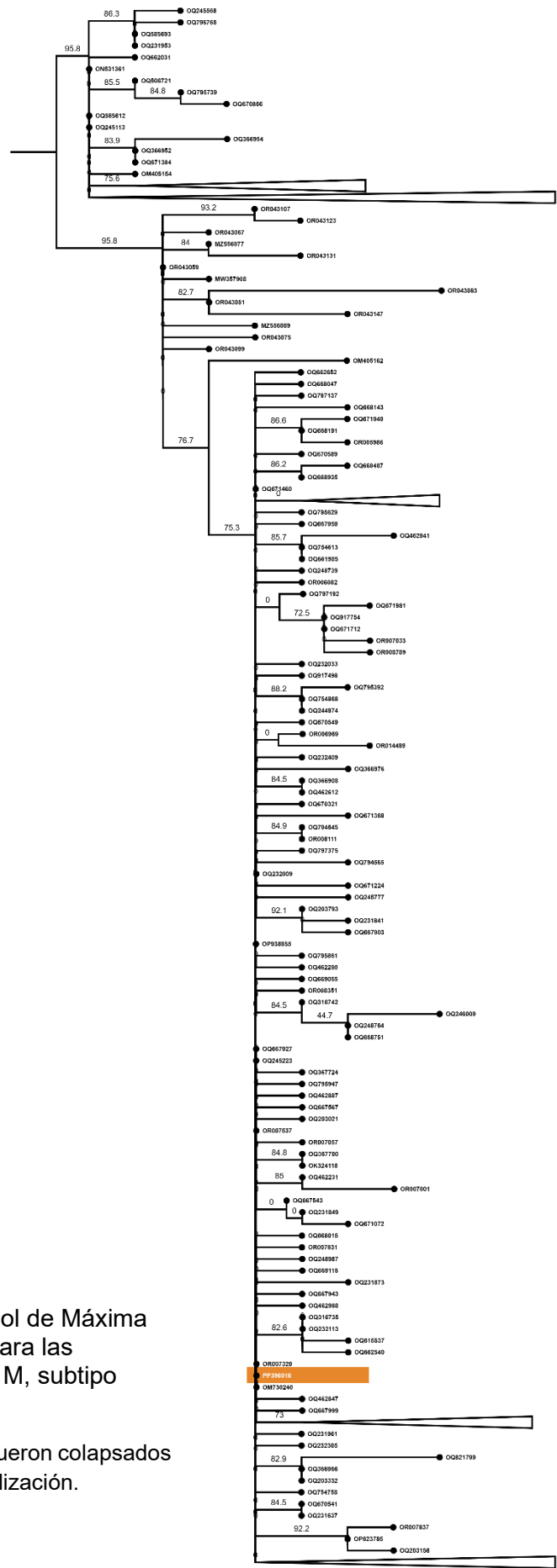
Las secuencias de M para el subtipo H3N2 (Figura 22) se agruparon en dos clados. Trece aislados se distribuyeron en tres subconjuntos con probabilidades posteriores de 84, 85.6 y 90. Estas muestras fueron reportadas en el noreste de los Estados Unidos (Connecticut, Maryland, Pennsylvania, New York, Tennessee, Vermont, Washington y Wisconsin) entre abril de 2022 y febrero de 2023. Una muestra se agrupó independientemente en un clado con una probabilidad posterior de 75.3. Esta agrupación incluyó aislados de Florida, EUA, y Sao Paulo, Brasil, entre el 11 de diciembre de 2022 y el 10 de enero de 2023.

Para la secuencia PP396016 del subtipo H1N1pdm09 (Figura 23), esta se agrupó con secuencias de Estados Unidos con una probabilidad posterior de 75.3. Estas secuencias fueron aisladas entre agosto de 2022 y febrero de 2023.

Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.7.



**Figura 22.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de M, subtipo H3N2.



**Figura 23.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de M, subtipo H1N1pdm09.

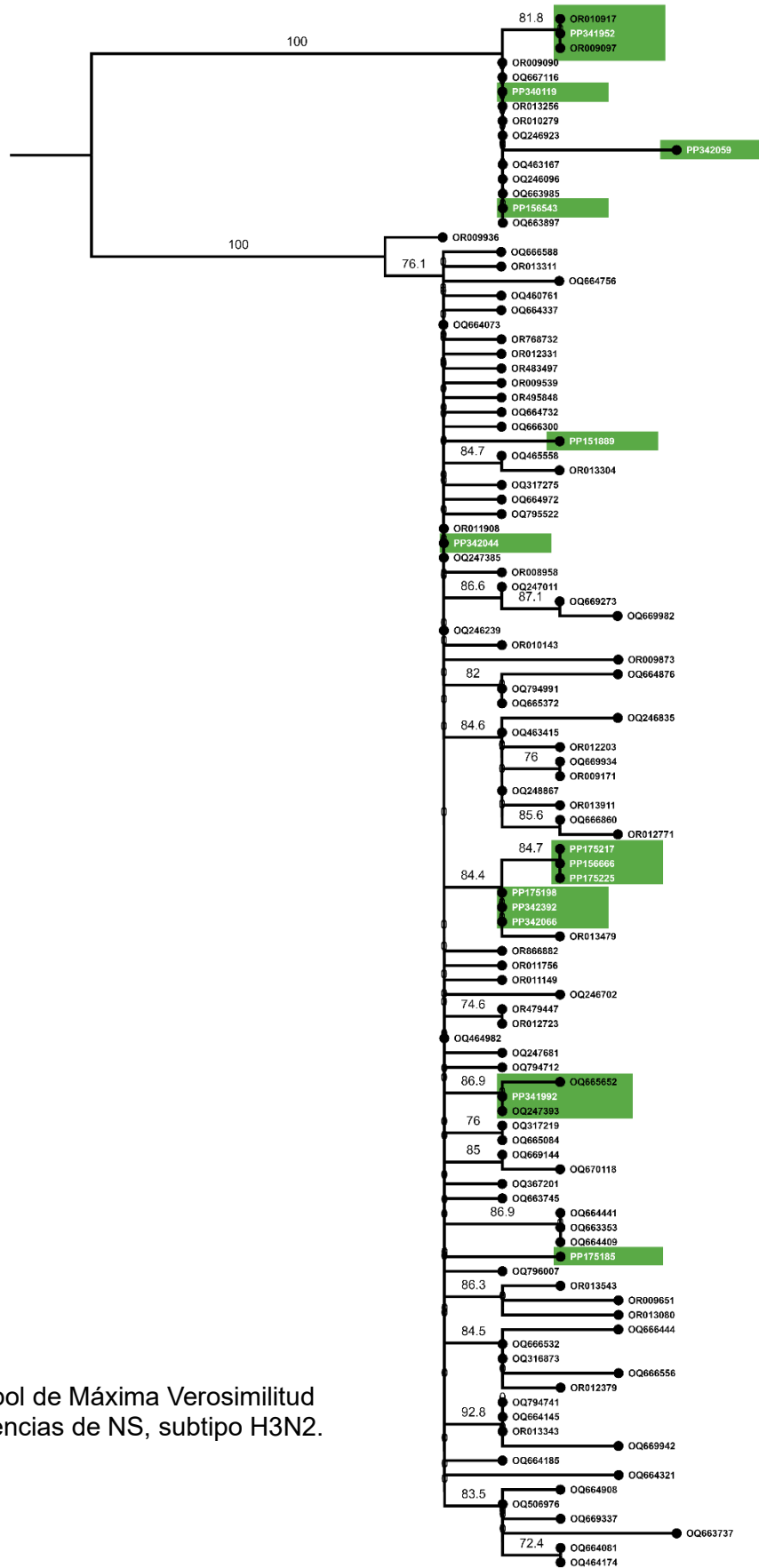
Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.

## **8. NS (No Estructural 1 y 2)**

Las secuencias del subtipo H3N2 (Figura 24) se agruparon en dos clados. Diez de ellas se distribuyeron en cinco subconjuntos con probabilidades posteriores de 76.1, 84.4 y 84.7, con secuencias aisladas en el sur de los Estados Unidos (Florida, Oregón y Texas) entre noviembre de 2022 y enero de 2023. Por otro lado, cinco secuencias se distribuyeron en otro clado independiente con una probabilidad de 81.8, con muestras reportadas en el centro-sur de Estados Unidos (Iowa, Kansas, Nuevo México, Minnesota, Oregón y Tennessee) entre noviembre de 2022 y enero de 2023.

La secuencia PP396017 del subtipo H1N1pdm09 (Figura 25) se agrupó en un subconjunto con una probabilidad posterior de 91. Esta agrupación incluyó secuencias provenientes de Idaho, Estados Unidos, entre el 20 de diciembre de 2022 y el 27 de enero de 2023.

Los metadatos de cada clado se pueden consultar anexo 4.8.



**Figura 24.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NS, subtipo H3N2.



**Figura 25.** Árbol de Máxima Verosimilitud para las secuencias de NS, subtipo H1N1pdm09.

Algunos clados fueron colapsados para mejor visualización.

### **Mutaciones encontradas en los aislados secuenciados**

De acuerdo con la herramienta *flusurver*, se encontró que el total de las muestras (n=15) no presentaban mutaciones que le confirieran resistencia a los antivirales oseltamivir, zanamivir y baloxavir marboxil, esto reportado para los segmentos de Polimerasa Ácida, Hemaglutinina y Neuraminidasa, 3, 4 y 6 respectivamente.

En la tabla 10, se presenta el panorama completo de mutaciones. Siendo las de mayor relevancia epidemiológica para cada segmento:

- Polimerasa Básica 2: E627K.
- Polimerasa Ácida, N409Y.
- Hemaglutinina: K159R, I156K, N202D, S172H, y N138D.
- Neuraminidasa: G346S, E344K, S150R, S329N, y D463N.

Se prevé que estas mutaciones les confieren mayor virulencia respecto a las cepas de referencia, debido a mayor afinidad al receptor celular, deriva antigénica, modificación del epítipo viral o evasión del reconocimiento a los anticuerpos neutralizantes formados por vacunación previa.



**Tabla 10.** Mutaciones encontradas para los segmentos de Polimerasa Ácida, Hemaglutinina y Neuraminidasa.

ID	TIPO	SEGMENTO	REFERENCIA	%AA IDENTIDAD	% COBERTURA	MUTACIONES
81570	H1N1	PA	A/Victoria/4897/2022(H1N1)	99.86	100	N409Y
		NA	A/Sydney/5/2021(H1N1)	99.78	99.78	N50D
		HA	A/Sydney/5/2021(H1N1)	98.23	100	D277E, T294A, E373D, I435V, N468H, P154S, K159R, D239X, R240X, N111D
79196	H3N2	PA	A/Kansas/14/2017(H3N2)	99.302	100	G101E, I311M, Y321C, S364G, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.58	100	R315K, E66K, F95V, D117E, I156K, S172H, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	98.93	99.78	V263I, G346S, E344K
79910	H3N2	HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.76	100	E66K, F95V, R315K, I156K, S172H, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.14	100	V263I, R315S, G346S, I469V
80045	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.58	100	D27N, K262N, Y321C
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.41	100	D69N, H72Y, N394S, N505T, N202D, I208F, N112S, N138D, G241D
		NA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	99.36	100	H184Y, S150R, S329N

80620	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.3	100	G101E, D216N, I311M, Y321C, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.76	100	D69G, D120G, K292R, R315K, K519R, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.36	100	N465S, D463N, T238A
81401	H3N2	HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.76	100	D69G, D120G, K292R, I494M, K519R, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.36	100	N465S, D463N, T238A
81577	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.16	100	G101E, D216N, I311M, Y321C, K605R, S648N
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	99.11	100	D69G, D120G, K292R, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.36	100	N465S, D463N, T238A
81578	H3N2	HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.94	100	E66K, F95V, I156K, S172H, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	98.93	100	V263I, R315S, G346S, Q391K, I469V
81767	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.16	100	G101E, L187I, D216N, I311M, Y321C, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	99.11	100	D69G, D120G, K292R, N202D, G241D

		NA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	99.14	100	D346S, S150R, S329N, T238A
81917	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.16	100	G101E, L187I, D216N, I311M, Y321C, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.94	100	K292R, K519R, D69G, D120G, N202D, G241D
		NA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	99.14	100	D346S, S150R, S329N, T238A
82169	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.3	100	G101E, I311M, Y321C, S364G, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.41	100	E66K, F95V, K98E, R315K, D117E, I156K, S172H, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.14	100	V263I, R315S, G346S, I469V
82699	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.3	100	G101E, D216N, I311M, Y321C, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.58	100	I64L, D69G, D120G, K292R, K403R, K519R, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.14	100	H184Y, N465S, D463N, T238A
82702	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.3	100	G101E, D216N, I311M, Y321C, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.76	100	I64L, D69G, D120G, K292R, K403R, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.14	100	H184Y, N465S, D463N, T238A
82760	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.3	100	G101E, D216N, I311M, Y321C, K605R

		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.76	100	I64L, D69G, D120G, K292R, K403R, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.14	100	H184Y, N465S, D463N, T238A
82761	H3N2	PA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.3	100	G101E, D216N, I311M, Y321C, K605R
		HA	A/Darwin/9/2021(H3N2)	98.76	100	I64L, D69G, D120G, K292R, K519R, N202D, G241D
		NA	A/SouthAustralia/34/2019(H3N2)	99.14	100	H184Y, N465S, D463N, T238A

## DISCUSIÓN

Se logró secuenciar 8 genomas completos y 7 genomas parciales de virus de la Influenza A utilizando la tecnología de la secuenciación de nanoporos de Oxford mediante el enfoque de secuenciación de amplicones de ADNc. Para este propósito, se amplificaron simultáneamente los ocho segmentos de ARNv de Influenza A por medio de RT-PCR, donde los cebadores utilizados reconocen las regiones terminales 3' y 5' conservadas de 12 - 13 nucleótidos, presentes en todos los subtipos de influenza A (Zhou *et al.*, 2009). Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron procesados utilizando el flujo de trabajo estándar para ADNc en el dispositivo MinION.

Es relevante mencionar que los ocho segmentos genéticos variaron en tamaño, oscilando entre 0.89 y 2.3 kb, observando una disparidad en la cantidad de amplificación para cada segmento viral, mostrando una preferencia de amplificación por los segmentos M (982 nt), NA (1410 nt) y HA (1701nt), por lo cual se observan con mayor intensidad estas bandas en las electroforesis en gel de agarosa.

Los segmentos 1 (PB2 – 2.280 kb), 2 (PB1 – 2.274 kb) y 3 (PA – 2.151 kb) al tener mayor cantidad de bases, puede verse disminuida la eficiencia de amplificación (Lewandowski, *et al.*, 2019). Además, se observó que estas mismas secuencias muestran una mayor cobertura en sus extremos 5' y 3', pero presentan una menor cobertura en la región central del gen, esta variación en la cobertura de lectura se atribuye a un sesgo en el proceso de amplificación, este patrón se puede deber a presencia de partículas virales defectuosas o muestras de ARNv conservadas en condiciones poco favorables (procesos de congelación y descongelación), así como en el título de partículas virales en la muestra (Saira *et al.*, 2013).

Por otro lado, los subtipos obtenidos de los aislados secuenciados, el predominante fue H3N2 en un 94%, y en menor medida fue H1N1pdm09 en un 6%, estos datos concuerdan con lo reportado para esa temporada con datos

provenientes de la secretaria de Salud de México (DGE, 2023) y la Organización Mundial de la Salud para el hemisferio norte (WHO, 2023).

En cuanto a la asignación de clados de los aislados secuenciados, del subtipo de H3N2 el clado predominante fue 3C.2a1b.2a.2a.1 con un 64%, lo cual es congruente con datos reportados por Fall, A., *et al.* en 2023, donde se realizó una vigilancia del periodo 2022 – 2023 de muestras provenientes del sistema de salud de Hospitales Johns Hopkins. Por otro lado, en menor porcentaje fueron los subclados 3C.2a1b.2a.2a.3 y 3C.2a1b.2a.2b. En cuanto a la única muestra de H1N1pdm09, fue agrupada en el clado 6B.1A.5a.2a.1, el cual fue predominante durante las primeras 21 semanas de la temporada de 2022 – 2023 para las secuencias reportadas en el hemisferio norte europeo (ECDPC, 2023).

Para las arboles filogenéticos de los genes internos y de superficie, del subtipo H3N2, más del 90% de las secuencias fueron agrupadas con aislados provenientes de los Estados Unidos en la temporalidad de octubre 2022 a Febrero 2023 con probabilidades posteriores mayores a 70%, lo que se atribuye a una mayor diversidad genética en secuencias distribuidas en espacio – temporalidad amplias para la región del norte de América, debido a que existe deficiencia en la vigilancia de las cepas circulantes en nuestro país, esto por el tipo de vigilancia epidemiológica existente (Magee, *et al.* 2017).

En las dos reconstrucciones filogenéticas para Hemaglutinina tanto del subtipo H3N2 y H1N1pdm09, al ser sometido a una fuerte presión selectiva debido a la influencia de la modificación constante de la proteína, esto para evadir el reconocimiento del sistema inmune adaptativo, la tasa de mutación promedio es  $5.72 \times 10^{-3}$  sustituciones de nucleótidos/año es superior a la encontrada en este trabajo ( $3.89 \times 10^{-3}$  sustituciones de nucleótidos/año) por lo que se infiere que debido a los aislados pertenecieron a un corto espacio de muestreo para solo un centro hospitalario, puede tener una menor variabilidad en las mutaciones y por lo tanto una baja tasa evolutiva (Galli, *et al.*, 2023).

El análisis de mutaciones reveló para el segmento de la Polimerasa Básica 2, un cambio de ácido glutámico por una lisina en la posición 627 (E627K) en el total

de las muestras del subtipo H3N2, dicha sustitución se ha reportado que le confiere mayor virulencia similar al subtipo H7N9 Aviar de alta patogenicidad, debido a una mayor eficiencia de replicación viral, además abre la pauta de un salto zoonótico de adaptación de cepas aviar al huésped humano (Liu., *et al.* 2020).

En el segmento de la Polimerasa Ácida, que es el blanco farmacológico del baloxavir marboxil, no se encontraron mutaciones asociadas a resistencia a este antiviral. Sin embargo, se detectó un cambio en la secuencia de asparagina por tirosina en la posición 409 (N409Y) en el aislado del subtipo H1N1pdm09. Este cambio en la secuencia aminoacídica ya se ha reportado anteriormente y se ha observado que mutaciones en esta posición permiten a cepas aviares adaptarse a huéspedes mamíferos, como hurones y cerdos de granjas. Por lo tanto, esta mutación descrita en este estudio plantea la incógnita de si las cepas de animales de granja se están adaptando al nuevo huésped humano, similar a lo ocurrido en la pandemia por la cepa H1N1 porcina en 2009 (Yamayoshi, S., *et al.* 2014).

Para el segmento de hemaglutinina, se encontró que en todas las muestras evaluadas tanto del subtipo H3N2 como en el H1N1pdm09, las mutaciones K159R, N202D y R240Q. Estos cambios en dichas posiciones se han relacionado con una mayor afinidad de la proteína viral con el receptor celular ácido siálico. Además, se ha descrito que estas mutaciones confieren la capacidad de deriva antigénica, permitiendo la evasión y escape del sistema inmune adaptativo (Suttie, A., *et al.* 2019).

Para el segmento 6, que codifica la enzima neuraminidasa, esencial para la liberación del virión de la célula hospedera hacia las células adyacentes, se encontraron en algunos de los aislados del subtipo H3N2 las mutaciones D463N y E433K. Se ha reportado que la acumulación de estas y otras mutaciones descritas por Lei y colaboradores en 2022 pueden conferir resistencia a los fármacos oseltamivir y zanamivir, que inhiben la actividad de esta proteína viral.

Este estudio, al ser exploratorio, seleccionó muestras a conveniencia de una población específica que recibe atención en el servicio de infectología del Hospital Universitario de la UANL. Por lo tanto, estos resultados proporcionan un primer acercamiento al uso de las tecnologías de NGS en el estudio de la epidemiología molecular del virus de Influenza A. Sin embargo, los resultados obtenidos podrían no representar la dinámica evolutiva de una zona con amplia movilidad social, como la zona metropolitana de Monterrey. Por ello, se requerirían investigaciones más amplias en tiempo, espacio y número de aislados para obtener inferencias más precisas sobre el comportamiento filodinámico de este y otros virus que circulan en las temporadas invernales, con implicaciones en la salud pública y la carga hospitalaria.



## **CONCLUSIÓN**

Se determinaron 106 segmentos completos del virus de Influenza A, encontrándose catorce muestras pertenecientes al subtipo H3N2 y una a H1N1pdm09.

Se encontró que los aislados secuenciados mayormente pertenecieron a clados circulantes en el hemisferio norte para la temporada invernal 2022 - 2023.

No se hallaron mutaciones relacionadas a resistencia a los antivirales oseltamivir, zanamavir, baloxavir marboxil, sin embargo, se encontraron mutaciones que conferían mayor virulencia respecto a las cepas de referencia.

## ANEXOS

### 1. Genomas de referencia

**Tabla 11.** Números acceso de genomas de referencia para cada tipo y segmento viral.

<b>H1N1</b>	S1: NC_026438.1 S2: NC_026435.1 S3: NC_026437.1 S4: NC_026433.1 S5: NC_026436.1 S6: NC_026434.1 S7: NC_026431.1 S8: NC_026432.1
<b>H2N2</b>	S1: NC_007378.1 S2: NC_007375.1 S3: NC_007376.1 S4: NC_007374.1 S5: CY125849.1 S6: CY031597.1 S7: NC_007377.1 S8: CY125850.1
<b>H3N2</b>	S1: NC_007373.1 S2: NC_007372.1 S3: NC_007371.1 S4: NC_007366.1 S5: NC_007369.1 S6: NC_007368.1 S7: NC_007367.1 S8: NC_007370.1
<b>H5N1</b>	S1: NC_007357.1 S2: NC_007358.1

	S3: NC_007359.1 S4: NC_007362.1 S5: NC_007360.1 S6: NC_007361.1 S7: NC_007363.1 S8: NC_007364.1
<b>H7N9</b>	S1: NC_026422.1 S2: NC_026423.1 S3: NC_026424.1 S4: NC_026425.1 S5: NC_026426.1 S6: NC_026429.1 S7: MN037519.1 S8: CY191663.1
<b>H9N2</b>	S1: AF258835.1 S2: AF258816.1 S3: AF257191.1 S4: NC_004908.1 S5: NC_004905.2 S6: KY785903.1 S7: NC_004907.1 S8: NC_004906.1

## 2. Línea de comando para ensamble por referencia

```
mkdir -p muestras/1
```

```
cat barcoded/barcode54/* > muestras/1/1.fastq
```

```
cd muestras/1
```

```
minimap2 -ax map-ont -t 20 ../../ref.fasta 1.fastq | samtools view -bS -F 4
```

```
|samtools sort -o 1.sorted.bam
```

```
samtools index 1.sorted.bam
```

```

cd ../../

#!/bin/bash

if [ -f "$1.fa" ]
then
    minimap2 -a -x map-ont -t 8 $1.fa $1.fq | samtools view -bS -F 4 | samtools sort
-o $1_sorted.bam && samtools index $1_sorted.bam
    medaka consensus --model r941_min_sup_g507 --threads 8 $1_sorted.bam
$1_sorted.hdf
    medaka variant $1.fa $1_sorted.hdf $1_sorted.vcf
    medaka tools annotate --pad 25 $1_sorted.vcf $1.fa $1_sorted.bam
$1_sorted.vcf
    bgzip -f $1_sorted.vcf
    tabix -p vcf $1_sorted.vcf.gz
    vcfutils --gzvcf $1_sorted.vcf.gz --remove-filtered-all --recode --stdout | bgzip -
f > $1_sorted.pass.vcf.gz
    #bcftools consensus -f $1.fa $1_sorted.pass.vcf.gz -o
$1_polished_by_medaka.fa
    bcftools consensus -f $1.fa $1_sorted.pass.vcf.gz -o
$1_polished_by_medaka.unmasked.fa
    bedtools genomecov -ibam $1_sorted.bam -bga | awk '$4<10' | bedtools
maskfasta -fi $1_polished_by_medaka.unmasked.fa -bed - -fo
$1_polished_by_medaka.fa
    rm $1_sorted.hdf $1_sorted.pass.vcf.gz $1_sorted.pass.vcf.gz.tbi
$1_sorted.vcf.gz $1_sorted.vcf.gz.tbi $1.fa.fai out.log

else
    echo "El archivo $1 no existe"
if

```

### 3. Secuencias cargadas a NCBI GenBank

**Tabla 12.** Números de acceso para secuencias cargadas a GenBank.

ID Muestra	Numero de Acceso
82761	PP342060-PP342066
79196	PP340113-PP340119
82699	PP156659-PP156666
82169	PP156536-PP156543
82760	PP175218-PP175225
81767	PP175191-PP175198
82702	PP175210-PP175217
81401	PP341988-PP341992
81577	PP342039-PP342044
81917	PP342386-PP242392
79910	PP341948-PP341952
80045	PP175178-PP175185
80620	PP151882-PP151889
81578	PP342055-PP342059
81570	PP396010-PP396017

#### 4. Metadatos de secuencias

##### 4.1 PB2 (Polimerasa Básica 2)

**Tabla 13.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB2, subtipo H3N2.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ764719	A/United Kingdom/GSTT_IAV_ED84/2022(H3)	Reino Unido	2022-12-22	Department of Infection, Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust
OQ754456	A/Michigan/UOM10048553953/2022(H3N2)	USA	2022-11-23	Influenza Data Processing and Communication Center
OQ917558	A/Michigan/UOM10048471650/2022(H3N2)	USA	2022-11-17	Influenza Data Processing and Communication Center
PP175178	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina
OQ316912	A/Arizona/USAFSAM-13658/2022(H3N2)	USA	2022-12-01	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health
OQ246828	A/Michigan/83/2022(H3N2)	USA	2022-11-10	Centers for Disease Control and Prevention
OQ917542	A/Michigan/UOM10048344397/2022(H3N2)	USA	2022-11-10	Influenza Data Processing and Communication Center
OQ797458	A/USA/10049083452/2022(H3N2)	USA	2022-12-28	Influenza Data Processing and Communication Center
PP342386	A/México/81917/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-04	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175191	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ460611	A/Hawái/57/2022(H3N2)	USA	2022-11-30	Centers for Disease Control and Prevention
OQ464703	A/Iowa/53/2022(H3N2)	USA	2022-11-27	Centers for Disease Control and Prevention
OQ464167	A/Arizona/60/2022(H3N2)	USA	2022-11-14	Centers for Disease Control and Prevention
OQ246964	A/Mississippi/31/2022(H3N2)	USA	2022-11-02	Centers for Disease Control and Prevention
OQ368330	A/Texas/USAFSAM-14019/2022(H3N2)	USA	2022-12-14	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health
OQ247306	A/North Dakota/26/2022(H3N2)	USA	2022-11-19	Centers for Disease Control and Prevention
PP342060	A/México/82761/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León

OQ465223	A/New México/43/2022(H3N2)	USA	2022-11-16	Centers for Disease Control and Prevention
PP175210	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175218	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156659	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP340113	A/México/79196/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156536	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ246392	A/Idaho/40/2022(H3N2)	USA	2022-11-07	Centers for Disease Control and Prevention
OQ246256	A/Arizona/53/2022(H3N2)	USA	2022-11-05	Arizona Department of Health Services
OQ460650	A/Arizona/69/2022(H3N2)	USA	2022-12-01	Arizona Department of Health Services

**Tabla 14.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB2, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ992842	A/Illinois/USAFSAM-14162/2023(H1N1)	EUA	2023-03-29	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health
OQ316937	A/New Mexico/USAFSAM-13778/2022(H1N1)	EUA	2022-11-29	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health
PP396010	A/Mexico/81570/2022(H1N1)	MÉXICO	2022-12-29	Universidad Autonoma de Nuevo Leon
PP563502	A/Los Angeles County/LACPHL-INF00269/2022(H1N1)	EUA	2022-12-26	Los Angeles County Public Health Laboratories
OQ615543	A/New Mexico/USAFSAM-14115/2022(H1N1)	EUA	2022-12-13	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health
OQ797376	A/USA/10049072248/2022(H1N1)	EUA	2022-12-28	Influenza Data Processing and Communication Center

## 4.2 PB1 (Polimerasa Básica 1)

Tabla 15. Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB1, subtipo H3N2.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OR009660	A/Colorado/03/2023(H3N2)	EUA	2023-01-01	WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza, Influenza Division, Centers for Disease Control and Prevention
OQ669881	A/New Jersey/94/2022(H3N2)	EUA	2022-12-15	New Jersey Department of Health & Senior
OR010273	A/Florida/152/2022(H3N2)	EUA	2022-12-22	Florida Department of Health-Tampa
OQ663387	A/Maine/37/2022(H3N2)	EUA	2022-12-05	Maine Health and Environmental Testing
OQ663379	A/Maine/36/2022(H3N2)	EUA	2022-12-04	Maine Health and Environmental Testing
OR009891	A/Connecticut/10/2023(H3N2)	EUA	2023-01-18	Connecticut Department. of Public Health
PP156537	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175179	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR140220	A/Nicaragua/727285.PB1/2022(H3N2)	NICARAGUA	2022-06-22	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital
OR139552	A/Nicaragua/727261.PB1/2022(H3N2)	NICARAGUA	2022-06-11	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital
OR140204	A/Nicaragua/727281.PB1/2022(H3N2)	NICARAGUA	2022-07-02	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital
PP151883	A/México/80620/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-14	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ663347	A/Kentucky/22/2022(H3N2)	EUA	2022-12-11	Kentucky Division of Laboratory Services
OQ663044	A/Florida/84/2022(H3N2)	EUA	2022-12-12	Florida Department of Health-Jacksonville
OQ664966	A/Colorado/77/2022(H3N2)	EUA	2022-12-25	Colorado Department of Health Lab
OR011894	A/Montana/14/2023(H3N2)	EUA	2023-01-16	Helena Montana Laboratory Services Bureau
PP175192	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR013473	A/Texas/04/2023(H3N2)	EUA	2023-01-16	Texas Department of State Health Services-Laboratory Services
PP175219	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175211	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156660	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León



**Tabla 16.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PB1, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ794849	A/USA/10048673429/2022(H1N1)	EUA	2022-12-01	Influenza Data Processing and Communication Center
OQ795346	A/USA/10048732346/2022(H1N1)	EUA	2022-12-06	Influenza Data Processing and Communication Center
OQ796650	A/USA/10048843616/2022(H1N1)	EUA	2022-12-12	Influenza Data Processing and Communication Center
OQ670963	A/Georgia/63/2022(H1N1)	EUA	2022-12-17	Georgia Public Health Laboratory
PP396011	A/México/81570/2022(H1N1)	MÉXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ615534	A/Missouri/USAFSAM-14112/2023(H1N1)	EUA	2023-02-09	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health

### 4.3 PA (Polimerasa Ácida)

**Tabla 17.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PA, subtipo H3N2.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
PP175180	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR140203	A/Nicaragua/727281.PA/2022(H3N2)	NICARAGUA	2022-07-02	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital
OR139551	A/Nicaragua/727261.PA/2022(H3N2)	NICARAGUA	2022-06-11	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital
OQ664180	A/Tennessee/60/2022(H3N2)	EUA	2022-12-05	Tennessee Department of Health Laboratory-Nashville
OR140219	A/Nicaragua/727285.PA/2022(H3N2)	NICARAGUA	2022-06-22	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital
PP156538	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP340114	A/México/79196/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ460652	A/Arizona/69/2022(H3N2)	EUA	2022-12-01	Arizona Department of Health Services
OR009358	A/Arizona/69/2022(H3N2)	EUA	2022-12-22	Arizona Department of Health Services
OQ664943	A/Colorado/72/2022(H3N2)	EUA	2022-12-11	Colorado Department of Health Lab
PP342061	A/México/82761/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175212	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156661	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175220	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR010441	A/Hawái/06/2023(H3N2)	EUA	2023-01-24	State of Hawaii Department of Health
PP342039	A/México/81577/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP151884	A/México/80620/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-14	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ664967	A/Colorado/77/2022(H3N2)	EUA	2022-12-25	Colorado Department of Health Lab
PP175193	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342387	A/México/81917/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-04	Universidad Autónoma de Nuevo León

**Tabla 18.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de PA, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ795349	A/USA/10048732346/2022(H1N1)	EUA	2022-12-06	CEIRR Influenza Data Processing and Communication Center (Idpcc)
OQ506953	A/Florida/USAFSAM-14042/2022(H1N1)	EUA	2022-12-20	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health Submission Group
PP396012	A/México/81570/2022(H1N1)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ821844	A/Rheinland-Pfalz/USAFSAM-14132/2023(H1N1)	ALEMANIA	2023-01-29	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health Submission Group
OQ821846	A/Rheinland-Pfalz/USAFSAM-14137/2023(H1N1)	ALEMANIA	2023-02-02	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health Submission Group

#### 4.4 HA (Hemaglutinina)

**Tabla 19.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de HA, subtipo H3N2.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ202774	A/Rhode Island/40/2022(H3N2)	EUA	2022-09-06	Rhode Island Department of Health
OQ202790	A/Rhode Island/42/2022(H3N2)	EUA	2022-09-06	Rhode Island Department of Health
OQ234245	A/Oregon/33/2022(H3N2)	EUA	2022-09-11	Oregon Public Health Laboratory
OQ202455	A/Arizona/41/2022(H3N2)	EUA	2022-09-16	Arizona Department of Health Services
OQ463459	A/Rhode Island/43/2022(H3N2)	EUA	2022-09-26	Rhode Island Department of Health
OQ233416	A/Michigan/50/2022(H3N2)	EUA	2022-10-02	Michigan Department of Community Health
OQ234739	A/Utah/34/2022(H3N2)	EUA	2022-10-09	Utah Department of Health
OQ461355	(A/New Hampshire/31/2022(H3N2)	EUA	2022-11-06	New Hampshire Public Health Laboratories
PP175181	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ233734	A/Missouri/15/2022(H3N2)	EUA	2022-10-10	Missouri Department. of Health & Senior Services
OQ233368	A/Louisiana/12/2022(H3N2)	EUA	2022-10-26	Louisiana Department of Health and Hospitals
PP151885	A/México/80620/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-14	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP341988	A/México/81401/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342040	A/México/81577/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175194	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342388	A/México/81917/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-04	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156662	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175213	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342062	A/México/82761/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175221	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP340116	A/México/79196/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP341948	A/México/79910/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-06	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ664944	A/Colorado/72/2022(H3N2)	EUA	2022-12-11	Colorado Department of Health Lab
PP156539	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León

OQ669899	A/New Jersey/95/2022(H3N2)	EUA	2022-12-21	New Jersey Department of Health & Senior Services
PP342055	A/México/81578/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR013867	A/Washington/03/2023(H3N2)	EUA	2023-01-03	Washington State Public Health Laboratory

**Tabla 20.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de HA, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ797190	A/USA/10049005114/2022(H1N1)	EUA	2022-12-21	Influenza Data Processing and Communication Center
PP396013	A/México/81570/2022(H1N1)	MÉXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León

#### 4.5 NP (Nucleoproteína)

**Tabla 21.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NP, subtipo H3N2.

NC	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ460552	A/Delaware/82/2022(H3N2)	EUA	2022-12-07	Delaware Public Health Lab
PP175182	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR009169	A/Florida/158/2022(H3N2)	EUA	2022-12-28	Florida Department of Health-Tampa
OR013908	A/Washington/09/2023(H3N2)	EUA	2023-01-05	Washington State Public Health Laboratory
OR495834	A/Michigan/UOM10049205585/2023(H3N2)	EUA	2023-01-06	CEIRR Influenza Data Processing and Communication Center
OR013037	A/Pennsylvania/13/2023(H3N2)	EUA	2023-01-13	Pennsylvania Department of Health
PP340116	A/México/79196/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ460974	A/Hawái/61/2022(H3N2)	EUA	2022-12-01	State of Hawaii Department of Health
PP341949	A/México/79910/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-06	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ664945	A/Colorado/72/2022(H3N2)	EUA	2022-12-11	Colorado Department of Health Lab
OQ666417	A/Nevada/46/2022(H3N2)	EUA	2022-12-19	Southern Nevada Public Health Lab
OQ664501	A/Arizona/75/2022(H3N2)	EUA	2022-12-21	Arizona Department of Health Services
OQ666825	A/Oregon/84/2022(H3N2)	EUA	2022-12-24	Oregon Public Health Laboratory
OQ667097	A/South Dakota/64/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	South Dakota Public Health Lab
PP156540	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ669190	A/Vermont/18/2022(H3N2)	EUA	2022-12-05	Vermont Department of Health Laboratory
PP342056	A/México/81578/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ664689	A/Arizona/03/2023(H3N2)	EUA	2023-01-02	Arizona Department of Health Services
PP341989	A/México/81401/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR013476	A/Texas/04/2023(H3N2)	EUA	2023-01-16	Texas Department of State Health Services-Laboratory Services
PP342041	A/México/81577/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR010443	A/Hawái/06/2023(H3N2)	EUA	2023-01-24	State of Hawaii Department of Health
PP156663	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175214	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León

PP175222	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342063	A/México/82761/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR012073	A/Nevada/16/2023(H3N2)	EUA	2023-01-26	Southern Nevada Public Health Lab
OQ461006	A/Idaho/82/2022(H3N2)	EUA	2022-12-04	State of Idaho Bureau of Laboratories
PP151886	A/México/80620/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-14	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ666441	A/Nevada/49/2022(H3N2)	EUA	2022-12-20	Southern Nevada Public Health Lab
OR013892	A/Washington/06/2023(H3N2)	EUA	2023-01-12	Washington State Public Health Laboratory
OQ666841	A/Oregon/87/2022(H3N2)	EUA	2022-12-27	Oregon Public Health Laboratory
PP175195	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342389	A/México/81917/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-04	Universidad Autónoma de Nuevo León

**Tabla 22.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NP, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ316830	A/Oklahoma/USAFSAM-13801/2022(H1N1)	EUA	2022-11-28	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health Submission Group
OQ671904	A/South Dakota/48/2022(H1N1)	EUA	2022-11-28	South Dakota Public Health Lab
OQ794639	A/USA/10048645544/2022(H1N1)	EUA	2022-11-30	CEIRR Influenza Data Processing and Communication Center
OQ795396	A/USA/10048737134/2022(H1N1)	EUA	2022-12-06	CEIRR Influenza Data Processing and Communication Center
OQ796091	A/USA/10048809404/2022(H1N1)	EUA	2022-12-09	CEIRR Influenza Data Processing and Communication Center
PP396014	A/México/81570/2022(H1N1)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo Leo
OQ506781	A/Florida/USAFSAM-14043/2023(H1N1)	EUA	2023-01-03	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health Submission Group
OR166885	A/Arizona/USAFSAM-14181/2023(H1N1)	EUA	2023-01-17	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health Submission Group

#### 4.6 NA (Neuraminidasa)

**Tabla 23.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NA, subtipo H3N2.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
PP175183	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP151887	A/México/80620/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-14	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP341990	A/México/81401/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342042	A/México/81577/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175196	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342390	A/México/81917/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-04	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156664	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175215	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342064	A/México/82761/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175223	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ246261	A/Arizona/53/2022(H3N2)	EUA	2022-11-05	Arizona Department of Health Services
OQ464540	A/Idaho/40/2022(H3N2)	EUA	2022-11-07	State of Idaho Bureau of Laboratories
OQ247160	A/Montana/43/2022(H3N2)	EUA	2022-11-08	Helena Montana Laboratory Services Bureau
OQ233235	A/Idaho/32/2022(H3N2)	EUA	2022-11-25	State of Idaho Bureau of Laboratories
PP340117	A/México/79196/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP341950	A/México/79910/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-06	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ664946	A/Colorado/72/2022(H3N2)	EUA	2022-12-11	Colorado Department of Health Lab
PP156541	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ665602	A/Georgia/61/2022(H3N2)	EUA	2022-12-15	Georgia Public Health Laboratory
PP342057	A/México/81578/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR010612	A/Idaho/07/2023(H3N2)	EUA	2023-01-12	State of Idaho Bureau of Laboratories



**Tabla 24.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NA, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
PP396015	A/México/81570/2022(H1N1)	MÉXICO	29/12/2022	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ821803	A/Rheinland-Pfalz/USAFSAM-14132/2023(H1N1)	ALEMANIA	29/01/2023	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health
OQ821806	A/Rheinland-Pfalz/USAFSAM-14137/2023(H1N1)	ALEMANIA	02/02/2023	711th Human Performance Wing, United States Air Force School of Aerospace Medicine Public Health

#### 4.7 M (Proteína de Matriz)

Tabla 25. Datos de aislamientos para secuencias reportadas de M, subtipo H3N2.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OP433314	A/Human/New York City/PV63173/2022(H3N2)	EUA	2022-04-05	CEIRR Influenza Data Processing and Communication Center
PP340118	A/México/79196/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP341951	A/México/79910/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-06	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156542	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ667158	A/Tennessee/56/2022(H3N2)	EUA	2022-11-28	Tennessee Department of Health Laboratory-Nashville
OQ666923	A/Pennsylvania/96/2022(H3N2)	EUA	2022-12-19	Pennsylvania Department of Health
OQ666891	A/Pennsylvania/94/2022(H3N2)	EUA	2022-12-19	Pennsylvania Department of Health
OQ669710	A/Maryland/26/2022(H3N2)	EUA	2022-12-21	Maryland Department of Health and Mental Hygiene
OQ670277	A/Vermont/20/2022(H3N2)	EUA	2022-12-28	Vermont Department of Health Laboratory
PP342058	A/México/81578/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ667395	A/Wisconsin/03/2023(H3N2)	EUA	2023-01-04	Wisconsin State Laboratory of Hygiene
OR201274	A/Colorado/33/2023(H3N2)	EUA	2023-02-28	Colorado Department of Health Lab
OP101071	A/Washington/13327/2022(H3N2)	EUA	2022-04-13	USAFSAM/PHE, United States Air Force
OP845530	A/Washington/34/2022(H3)	EUA	2022-06-21	Washington State Public Health Laboratory
OP623729	A/Washington/40/2022(H3N2)	EUA	2022-07-02	Washington State Public Health Laboratory
PP151888	A/México/80620/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-14	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP341991	A/México/81401/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ669336	A/Connecticut/83/2022(H3N2)	EUA	2022-12-27	Connecticut Department. of Public Health
PP342043	A/México/81577/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175197	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ666299	A/Montana/03/2023(H3N2)	EUA	2023-01-02	Helena Montana Laboratory Services Bureau
PP342391	A/México/81917/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-04	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ666555	A/New México/09/2023(H3N2)	EUA	2023-01-12	New Mexico Department of Health
PP175216	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León

PP156665	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342065	A/México/82761/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175224	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR627975	A/Colorado/46/2023(H3N2)	EUA	2023-04-16	Colorado Department of Health Lab
OM098433	A/Sao Paulo/HIAE001/2021(H3N2)	BRASIL	2021-12-11	Clinical Laboratory, Hospital Israelita Albert Einstein
OP086346	A/Florida/12591/2022(H3N2)	EUA	2022-01-10	USAFSAM/PHE, United States Air Force
PP175184	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León

**Tabla 26.** Datos de aislamientos para secuencias reportadas de M, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OM730240	A/Pennsylvania/02/2021(H1N1)	EUA	2021-08-25	Pennsylvania Department of Health
OQ462988	A/Utah/58/2022(H1N1)	EUA	2022-10-28	Utah Department of Health
OQ231961	A/Maine/11/2022(H1N1)	EUA	2022-11-01	Maine Health and Environmental Testing Laboratory
OQ462847	A/Oregon/63/2022(H1N1)	EUA	2022-11-27	Oregon Public Health Laboratory
OQ667999	A/Illinois/60/2022(H1N1)	EUA	2022-12-26	Illinois Department of Public Health-Springfield
PP396016	A/México/81570/2022(H1N1)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR007329	A/Nevada/18/2023(H1N1)	EUA	2023-02-02	Southern Nevada Public Health Lab

#### 4.8 NS (No Estructural 1 Y 2)

Tabla 27. Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NS, subtipo H3N2.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
PP341952	A/México/79910/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-06	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR009097	A/Maryland/34/2022(H3N2)	EUA	2022-12-14	Maryland Department of Health and Mental Hygiene
OR010917	A/Iowa/15/2023(H3N2)	EUA	2023-01-20	Iowa State Hygenic Laboratory
OQ246923	A/Minnesota/50/2022(H3N2)	EUA	2022-11-02	Minnesota Department of Health
OQ246096	A/Kansas/30/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-15	Kansas Department of Health and Environment
PP340119	A/México/79196/2022(H3N2)	MEXICO	2022-11-26	Universidad Autonoma de Nuevo Leon
OQ663897	A/New México/57/2022(H3N2)	EUA	2022-12-06	New Mexico Department of Health
OR010279	A/Florida/152/2022(H3N2)	EUA	2022-12-22	Florida Department of Health-Tampa
PP342059	A/México/81578/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156543	A/México/82169/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-08	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ247385	A/Oregon/51/2022(H3N2)	EUA	2022-11-07	Oregon Public Health Laboratory
OQ664185	A/Tennessee/60/2022(H3N2)	EUA	2022-12-05	Tennessee Department of Health Laboratory-Nashville
PP175185	A/México/80045/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-07	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ796007	A/USA/10048801175/2022(H3N2)	EUA	2022-12-09	Influenza Data Processing and Communication Center
PP151889	A/México/80620/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-14	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342044	A/México/81577/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-29	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR010143	A/Florida/02/2023(H3N2)	EUA	2023-01-05	Florida Department of Health-Tampa
OR011908	A/Montana/14/2023(H3N2)	EUA	2023-01-16	Helena Montana Laboratory Services Bureau
PP175198	A/México/81767/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-02	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP342392	A/México/81917/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-04	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP175217	A/México/82702/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
PP156666	A/México/82699/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-16	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR013479	A/Texas/04/2023(H3N2)	EUA	2023-01-16	Texas Department of State Health Services
PP175225	A/México/82760/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León

PP342066	A/México/82761/2023(H3N2)	MEXICO	2023-01-17	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ247393	A/Oregon/52/2022(H3N2)	EUA	2022-11-08	Oregon Public Health Laboratory
PP341992	A/México/81401/2022(H3N2)	MEXICO	2022-12-26	Universidad Autónoma de Nuevo León
OQ665652	A/Hawái/62/2022(H3N2)	EUA	2022-12-27	State of Hawaii Department of Health

Tabla 28. Datos de aislamientos para secuencias reportadas de NS, subtipo H1N1pdm09.

ID	GENBANK ID	PAÍS	FECHA	INSTITUCIÓN
OQ662247	A/Idaho/98/2022(H1N1)	EUA	20/12/2022	State of Idaho Bureau of Laboratories
PP396017	A/México/81570/2022(H1N1)	MEXICO	29/12/2022	Universidad Autónoma de Nuevo León
OR005851	A/Idaho/14/2023(H1N1)	EUA	19/01/2023	State of Idaho Bureau of Laboratories
OR007042	A/Idaho/19/2023(H1N1)	EUA	27/01/2023	State of Idaho Bureau of Laboratories

## REFERENCIAS

- Alomía Zegarra, J. L., Rascón Pacheco, R. A., Lara Saldaña, G. J., Ramos Guerrero, J. A., Valdés Espinosa, R. A., Zepeda De Alba, J. N., Lehmann Mendoza, R., García Pérez, M. D. R., Dimas Huacuz, B., LastNameLastNameCortés Alcalá, R., López Ridaura, R., Nucamendi Cervantes, G. D. C., Zaragoza Jiménez, C. A., De La Garza Barroso, A. L., Ceballos Liceaga, S. E., López Martínez, I., Hernández Rivas, L., Stanford Camargo, A., López Sámano, A., ... Ortiz Gómez, L. F. (2020). LINEAMIENTO ESTANDARIZADO PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y POR LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA VIRAL. *Dirección General de Epidemiología*.
- Álvarez-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(6), 1-10.
- Álvarez-Salas, Blanca Esthela (2022) EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA INFLUENZA: ANÁLISIS GENÓMICO Y ASOCIACIÓN CON LA PRESENTACIÓN CLÍNICA EN SUJETOS INFECTADOS (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Anzures Gutiérrez, S. A., Segura Sánchez, V. A., Martínez Orozco, J. A., Hernández Gordillo, D., Sosa Hernández, Ó., & Martínez Hernández, L. (2020). Prevención, diagnóstico y tratamiento de la Influenza estacional. *Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica*. <http://www.cenetedifusion.com/CMGPC/GPC-SS-384-20/ER.pdf>
- Arellanos-Soto, D., Padilla-Rivas, G., Ramos-Jimenez, J., Galan-Huerta, K., Lozano-Sepulveda, S., Martinez-Acuña, N., ... & 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.
- Centers for Disease Control and Prevention, N. C. for I. and R. D. (2020, August 31). *Overview of Influenza Testing Methods*. <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/overview-testing-methods.htm>

- Centers for Disease Control and Prevention. (2022a). *Secuenciación genómica y caracterización genética del virus de la influenza*. <https://espanol.cdc.gov/flu/about/professionals/genetic-characterization.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention, N. C. for I. and R. Diseases. (2022b, December 12). *How Flu Viruses Can Change: “Drift” and “Shift”*. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>
- PLAN NACIONAL PARA LA PREPARACIÓN Y RESPUESTA ANTE LA INTENSIFICACIÓN DE LA INFLUENZA ESTACIONAL O ANTE UNA PANDEMIA DE INFLUENZA, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (2013).
- Chaimayo, C., Hayashi, T., Underwood, A., Hodges, E., & Takimoto, T. (2017). Selective incorporation of vRNP into influenza A virions determined by its specific interaction with M1 protein. *Virology*, *505*, 23–32. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2017.02.008>
- Comas, I., Cancino-Muñoz, I., Mariner-Llicer, C., Goig, G. A., Ruiz-Hueso, P., Francés-Cuesta, C., García-González, N., & González-Candelas, F. (2020). Uso de las tecnologías de secuenciación masiva para el diagnóstico y epidemiología de enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *38*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2020.02.006>
- Davis, W. W., Mott, J. A., & Olsen, S. J. (2022). The role of non-pharmaceutical interventions on influenza circulation during the COVID-19 pandemic in nine tropical Asian countries. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, *16*(3), 568–576. <https://doi.org/10.1111/IRV.12953>
- Dirección General de Epidemiología (2023) INFORME SEMANAL DE LA TEMPORADA DE INFLUENZA ESTACIONAL Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS 2022-2023 SEMANA 20-2023. Obtenido de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/826408/INFLUENZA\\_OVR\\_SE20\\_2023.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/826408/INFLUENZA_OVR_SE20_2023.pdf)
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., & Daniels, R. (2018). Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUL), 1581. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01581/BIBTEX>
- European Centre for Disease Prevention and Control, World Health Organization – European Region. (2023) Influenza Virus Characterization, Summary Report. Consultado en: WHO-EURO-2023-6189-45954-72777-eng.pdf

- Fall, A., Han, L., Yunker, M., Gong, Y. N., Li, T. J., Norton, J. M., ... & Mostafa, H. H. (2023). Evolution of influenza A (H3N2) viruses in 2 consecutive seasons of genomic surveillance, 2021–2023. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 10, No. 12, p. ofad577). US: Oxford University Press.
- Ganti, K., Bagga, A., Carnaccini, S., Ferreri, L. M., Geiger, G., Joaquin Caceres, C., Seibert, B., Li, Y., Wang, L., Kwon, T., Li, Y., Morozov, I., Ma, W., Richt, J. A., Perez, D. R., Koelle, K., & Lowen, A. C. (2022). Influenza A virus reassortment in mammals gives rise to genetically distinct within-host subpopulations. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34611-z>
- Galli, C., Pellegrinelli, L., Giardina, F., Ferrari, G., Renteria, S. C. U., Novazzi, F., ... & AMCLI-GLIViRe working group. (2023). On the lookout for influenza viruses in Italy during the 2021-2022 season: Along came A (H3N2) viruses with a new phylogenetic makeup of their hemagglutinin. *Virus Research*, 324, 199033.
- Han, J., Ganti, K., Sali, V. K., Twigg, C., Zhang, Y., Manivasagam, S., Liang, C. Y., Vogel, O. A., Huang, I., Emmanuel, S. N., Plung, J., Radoshevich, L., Perez, J. T., Lowen, A. C., & Manicassamy, B. (2021). Host factor Rab11a is critical for efficient assembly of influenza A virus genomic segments. *PLOS Pathogens*, 17(5), e1009517. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009517>
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo - Ministerio de Trabajo y Economía Social, V. S. del G. de España. (2022, May 3). *Virus de la gripe A* . <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/virus/virus-de-la-gripe-a>
- Ji, Z. X., Wang, X. Q., & Liu, X. F. (2021). NS1: A Key Protein in the “Game” Between Influenza A Virus and Host in Innate Immunity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 638. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.670177/BIBTEX>
- Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018a). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1, 4(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018b). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–21.



- <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y> *Journal of clinical microbiology*, 58(1), 10-1128.
- Lei, R., Tan, T.J.C., Hernandez Garcia, A. et al. Prevalence and mechanisms of evolutionary contingency in human influenza H3N2 neuraminidase. *Nat Commun* 13, 6443 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34060-8>
- Liu, W. et al. (2020). Dynamic PB2-E627K substitution of influenza H7N9 virus indicates the in vivo genetic tuning and rapid host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23807-23814
- Magee, D., Suchard, M. A., & Scotch, M. (2017). Bayesian phylogeography of influenza A/H3N2 for the 2014-15 season in the United States using three frameworks of ancestral state reconstruction. *PLoS computational biology*, 13(2), e1005389.
- McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2019). Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 39. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00039/BIBTEX>
- Mena, I., Nelson, M. I., Quezada-Monroy, F., Dutta, J., Cortes-Fernández, R., Lara-Puente, J. H., Castro-Peralta, F., Cunha, L. F., Trovão, N. S., Lozano-Dubernard, B., Rambaut, A., Van Bakel, H., & García-Sastre, A. (2016). Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *ELife*, 5(JUN2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.16777>
- Meyerson, N. R., Zhou, L., Guo, Y. R., Zhao, C., Tao, Y. J., Krug, R. M., & Sawyer, S. L. (2017). Nuclear TRIM25 Specifically Targets Influenza Virus Ribonucleoproteins to Block the Onset of RNA Chain Elongation. *Cell Host & Microbe*, 22(5), 627-638.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2017.10.003>
- National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD). (2023). *Tipos de virus de influenza*. <https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- Organización Mundial de la Salud. (2019, March 11). *La OMS lanza una nueva estrategia mundial contra la gripe*. <https://www.who.int/es/news/item/11-03-2019-who-launches-new-global-influenza-strategy>
- PAHO/WHO PanAmerican Health Organization. (2022). *Influenza and other respiratory viruses*. <https://www.paho.org/en/topics/influenza-and-other-respiratory-viruses>
- Pervez, M. T., Hasnain, M. J. U., Abbas, S. H., Moustafa, M. F., Aslam, N., & Shah, S. S. M. (2022). A Comprehensive Review of Performance of Next-

- Generation Sequencing Platforms. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3457806>
- Reina, J., & Reina, N. (2019). Baloxavir marboxil: un potente inhibidor de la endonucleasa cap-dependiente de los virus gripales. *Revista Española de Quimioterapia*, 32(1), 1. [/pmc/articles/PMC6372968/](https://pmc/articles/PMC6372968/)
- Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., Narro-Robles, J., & Miranda, F. D. P. (2017a). Comportamiento de las temporadas de influenza en México de 2010 a 2016, análisis y prospectiva. *Gaceta Médica de México*, 153, 205–218. [www.anmm.org.mx](http://www.anmm.org.mx)
- Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., Narro-Robles, J., & Miranda, F. D. P. (2017b). Comportamiento de las temporadas de influenza en México de 2010 a 2016, análisis y prospectiva. *Gaceta Médica de México*, 153, 205–218. [www.anmm.org.mx](http://www.anmm.org.mx)
- Ryu, W.-S. (2017). Chapter 15 - Influenza Viruses. In W.-S. Ryu (Ed.), *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (pp. 195–211). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00015-1>
- Saira, K., Lin, X., DePasse, J. V., Halpin, R., Twaddle, A., Stockwell, T., ... & Ghedin, E. (2013). Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus. *Journal of virology*, 87(14), 8064-8074.
- Suttie, A., Deng, Y. M., Greenhill, A. R., Dussart, P., Horwood, P. F., & Karlsson, E. A. (2019). Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses. *Virus Genes*, 55(6), 739-768.
- Tyrrell, C. S., Allen, J. L. Y., & Gkrania-Klotsas, E. (2021). Influenza: epidemiology and hospital management. *Medicine (Abingdon, England : UK Ed.)*, 49(12), 797. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2021.09.015>
- Uyeki, T. M., Bernstein, H. H., Bradley, J. S., Englund, J. A., File, T. M., Fry, A. M., Gravenstein, S., Hayden, F. G., Harper, S. A., Hirshon, J. M., Ison, M. G., Johnston, B. L., Knight, S. L., McGeer, A., Riley, L. E., Wolfe, C. R., Alexander, P. E., & Pavia, A. T. (2019). Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenza. *Clinical Infectious Diseases*, 68(6), e1–e47. <https://doi.org/10.1093/CID/CIY866>
- Uyeki, T. M., Hui, D. S., Zambon, M., Wentworth, D. E., & Monto, A. S. (2022). Influenza. *Lancet*, 400(10353), 693. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00982-5)

- Williams TGS, Snell LB, Alder C, Charalampous T, Alcolea-Medina A, Sehmi JK, Al-Yaakoubi N, Humayun G, Miah S, Lackenby A, Zambon M, Batra R, Douthwaite S, Edgeworth JD, Nebbia G. Feasibility and clinical utility of local rapid Nanopore influenza A virus whole genome sequencing for integrated outbreak management, genotypic resistance detection and timely surveillance. *Microb Genom.* 2023 Aug;9(8):mgen001083. doi: 10.1099/mgen.0.001083. PMID: 37590039; PMCID: PMC10483427.
- World Health Organization. (2022). *Influenza*. <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/influenza>
- World Health Organization (2023) Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2023- 2024 northern hemisphere influenza season. Obtenido de: 202302\_seasonal\_recommendation\_a.pdf (who.int)
- Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y2014. Virulence-Affecting Amino Acid Changes in the PA Protein of H7N9 Influenza A Viruses. *J Virol*88: <https://doi.org/10.1128/jvi.03155-13>
- Zhang, M., Liu, M., Bai, S., Zhao, C., Li, Z., Xu, J., & Zhang, X. (2021). Influenza A Virus–Host Specificity: An Ongoing Cross-Talk Between Viral and Host Factors. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.777885>
- Zhou, B., Donnelly, M. E., Scholes, D. T., St. George, K., Hatta, M., Kawaoka, Y., & Wentworth, D. E. (2009). Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza a viruses. *Journal of virology*, 83(19), 10309-10313.