



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

*DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS
CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA A(H1N1)pdm09, SU
RELACIÓN CON LA FRECUENCIA DE INFLUENZA
ESTACIONAL EN YUCATÁN Y CON LA VARIACIÓN
ANTIGÉNICA DURANTE EL PERÍODO 2013-2016*

Tesis presentada por:

Q.F.B. EDGAR ANDRÉS YAM POOL

En opción al grado:

Maestro en Investigación en Salud

Directores de Tesis:

DRA. GUADALUPE AYORA TALAVERA

M. EN C. S.P. PILAR EUGENIA GRANJA PÉREZ

Mérida, Yucatán Noviembre 2017



UADY
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

“Luz, Ciencia y Verdad”

**Posgrado Institucional en
Ciencias de la Salud**

Oficio: PICSA/150/17.
Octubre 16 de 2017.

La tesis, **“Determinación de los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09, su relación con la frecuencia de influenza estacional en Yucatán y con la variación antigénica durante el período 2013-2016”**, presentada por el QFB. **Edgar Andrés Yam Pool**, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestro en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de lo establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud.

Atentamente

UADY



POSGRADO INSTITUCIONAL
en CIENCIAS DE LA SALUD

Dra. Norma Elena Pérez Herrera
Coordinadora del Programa Institucional
en Ciencias de la Salud

Ccp. Archivo

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, la Dra. Guadalupe Ayora Talavera y la M. en C. S.P. Pilar Eugenia Granja Pérez por brindarme su valiosa experiencia científica y total apoyo para la realización de este trabajo.

A las Dras. Laura Conde, Martha Medina, Elsy Canché y los Dres. Guillermo Valencia, Víctor Arana por la revisión y consejos durante la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Yucatán por haberme otorgado todas las facilidades para poder cumplir con esta meta.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Virología por su compañía y consejos brindados.

Y en especial a mi señora madre y mi abuelo por su inquebrantable apoyo, este logro también es suyo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán con financiamiento del proyecto de Fondos Mixtos FOMIX-YUC-SA-003/12.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. ANTECEDENTES	4
3.1 Características del virus de influenza.....	4
3.2 Características de la proteína HA	5
3.3 Variabilidad viral de la HA	7
3.4 Respuesta inmune en Influenza	10
3.5 Inmunidad inducida por la vacunación	12
3.6 Cartografía antigénica como herramienta para determinar la variabilidad del virus de influenza	14
3.7 Situación de la Influenza A en Yucatán	16
IV. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos	18
V. HIPÓTESIS	19
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1 Tipo de estudio	20
6.2 Muestra	20
6.3 Diseño de estudio.....	23
6.4 Cepas de Influenza	24
6.5 Aislamiento viral	24
6.6 Ensayo de hemaglutinación	25
6.7 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación	25
6.8 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) para la amplificación del gen HA.....	26
6.9 Secuenciación	28
6.10 Análisis de las secuencias.....	28
6.11 Cartograma antigénico	29
VII. RESULTADOS.....	30
VIII. DISCUSIÓN.....	61
IX. CONCLUSIÓN.....	73
X. BIBLIOGRAFÍA	74

I. RESUMEN

Durante la pandemia causada por el virus de influenza A(H1N1)pdm09, estudios serológicos realizados a nivel mundial proporcionaron información valiosa acerca del riesgo de la población a infectarse con el virus de influenza A(H1N1)pdm09. Actualmente, este virus H1N1 se considera un virus estacional de tal manera que una gran proporción de la población posiblemente ha desarrollado inmunidad ya sea por infección natural o por vacunación.

El objetivo del presente proyecto de investigación fue determinar los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 en sueros de humano y su relación con la frecuencia de influenza estacional en Yucatán y con la variación antigénica del virus durante el período 2013-2016.

Los resultados de los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) demostraron que más del 60 % de los sueros analizados del período 2013-2016 poseen títulos de anticuerpos protectores ($\geq 1:40$) contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 con ligeras diferencias no significativas entre los virus analizados. Un análisis entre los títulos de anticuerpos protectores y los casos de influenza confirmados mostraron que existe una correlación positiva entre ambas variables, lo que sugiere que los títulos de anticuerpos están relacionados con la circulación del virus de influenza. Finalmente, a través de la cartografía antigénica se mostró que del año 2013 al 2016 se redujo en un 7 % el número de personas con títulos de anticuerpos protectores hacia la cepa de referencia A/California/07/2009, la cual se sigue utilizando en la composición de la vacuna. En conclusión, este estudio analizó por primera vez el estado inmune de una población el cual demostró que más de la mitad de la población estudiada posee títulos de anticuerpos protectores y éstos se relacionan con la frecuencia de casos de influenza estacional en Yucatán; además se constató a través de la cartografía antigénica que con el paso del tiempo la proporción de personas con títulos de anticuerpos protectores contra la cepa vacunal ha disminuido y por tanto se encuentran en riesgo a infectarse.

II. INTRODUCCIÓN

La influenza es un problema grave de salud pública con epidemias anuales que causan unos 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave y unas 250,000 a 500,000 muertes en todo el mundo.¹ La estacionalidad del virus de la influenza ha sido bien descrita en países de regiones templadas, donde la actividad de la influenza normalmente coincide con el invierno.²

Así mismo, pocos datos están disponibles en la distribución del virus de influenza en países tropicales y subtropicales como ocurre en el estado de Yucatán el cual se comporta como en las regiones subtropicales con circulación baja durante todo el año y dos picos epidémicos durante la primavera y verano, en un patrón diferente a zonas templadas donde el pico de incidencia ocurre durante el otoño e invierno³ principalmente entre los meses de noviembre a marzo como ocurre en el centro del país.⁴ La comprensión de la distribución de la actividad de la influenza es de importancia porque permite la implementación de intervenciones de salud pública para la prevención y control, así como la sincronización de las campañas de vacunación antes de la temporada que permitan a los pacientes desarrollar una respuesta inmune antes de la exposición probable al virus.²

En el año 2009 el estado de Yucatán, México, reportó casos de infección humana por causa del nuevo virus pandémico de influenza A(H1N1)pdm09; de hecho, durante la segunda ola de transmisión a nivel nacional, Yucatán ocupó el segundo lugar en el país en reportar más casos de infección, sólo por debajo de Chiapas.⁵ No obstante, desde su emergencia en el año 2009 el virus de influenza A(H1N1)pdm09 se ha mantenido antigénicamente similar, de tal manera que la cepa de referencia incluida en la vacuna A/California/07/2009, no se ha modificado.

Actualmente ocho años después este virus H1N1 se considera un virus estacional de tal manera que una gran proporción de la población posiblemente ha desarrollado inmunidad ya sea por infección natural o por vacunación, por tal motivo los estudios serológicos han proporcionado una mejor comprensión del estado de inmunidad humana por el virus de influenza A(H1N1)pdm09 en diferentes entornos. En particular, pueden evaluar los factores de riesgo para la infección y tasas de transmisión en las poblaciones definidas mediante la relación de detección de títulos de anticuerpos en suero como evidencia retrospectiva de la infección con información sobre la enfermedad, demografía y factores de comportamiento.⁶

Por esta razón, en este estudio se determinaron los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 en una muestra de sueros residuales colectados durante el período 2013-2016 para conocer el estado inmune de la población y analizar una posible relación con la frecuencia de la influenza estacional en la región. Finalmente, a través de la herramienta conocida como cartografía antigénica, se identificó si existe relación antigénica entre los anticuerpos detectados en sueros de humano colectados del período 2013-2016 y virus de influenza A(H1N1)pdm09 de referencia y aislados en el año 2013 y 2016.

III. ANTECEDENTES

3.1 Características del virus de influenza

El virus de influenza es un virus de ARN, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae. Tiene un genoma de 8 segmentos de ARN de polaridad negativa, que en general codifican para 12 proteínas aunque algunos de los segmentos codifican para dos.⁷ El virión posee una envoltura externa lipídica tomada de la membrana celular donde se encuentran las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y en el interior una capa formada por la proteína matriz y más internamente, encontramos la nucleocápside helicoidal formada por siete segmentos de ARN en el caso de los virus C y ocho segmentos en los virus A y B; este virus es pleomórfico,⁸ tiene un diámetro que va de 50 a 120 nm y se divide en 3 tipos serológicamente diferentes: A, B y C.⁹

Además de los antígenos de superficie, el genoma viral codifica para otras proteínas como la polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa ácida (PA), proteína de la nucleocápside (NP), proteína de la matriz (M1), proteína de la matriz 2 (M2); tanto M1 como M2 son codificadas por el mismo segmento de ARN pero con diferente marco de lectura, lo mismo ocurre con la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína no estructural 2 (NS2).⁸

El virus influenza tipo B ocasiona enfermedades en el humano, el tipo C se ha encontrado en humanos y en cerdos pero el tipo A que es el responsable de todas las pandemias de las que se tenga registro, se ha logrado aislar en cerdos, caballos, perros, aves acuáticas, aves de corral, humanos y otros mamíferos.¹⁰ Esto le permite recombinarse con facilidad y generar nuevas cepas; el cerdo es considerado el principal huésped intermediario para que se lleve a cabo la diseminación del virus influenza interespecies, esto es debido a

que posee receptores tanto para los virus aviares como para los de mamíferos.¹¹

Los virus influenza A son clasificados en subtipos dependiendo de las proteínas HA y NA. Se han descrito 18 tipos de HA y 11 tipos de NA.¹² En las aves acuáticas pueden coexistir 16 tipos de HA y 9 de NA y pueden presentarse hasta 144 combinaciones. Sólo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos subtipos de NA (N1 y N2) han circulado en la población humana en el último siglo durante las pandemias y epidemias estacionales anuales.¹³

3.2 Características de la proteína HA

La HA es una glicoproteína que contiene 2 a 3 sitios de glicosilación. La HA se une al ácido siálico (SA, ácido N-acetil-neuramínico) e induce la penetración de partículas virales por fusión de membranas a la célula huésped. La HA es el sitio antigénico de mayor importancia del virus de influenza y se encuentra en una proporción de 4-5:1 con respecto a la NA.⁸ La HA del virus influenza está sujeta a una tasa de mutación muy alta, estimada en cerca de 2×10^{-3} sustituciones de bases por posición por generación viral.¹⁰

La unión de HA del virus de influenza al receptor es un determinante clave de la gama de huéspedes y transmisión de virus a humanos y animales. El virus de influenza aviar preferentemente reconoce receptores celulares que contienen ácido siálico ligado en una conformación α -2,3 (SA α 2,3), mientras que los virus de influenza humana preferentemente reconocen receptores unidos en una conformación α -2,6 (SA α 2,6). Cambios en aminoácidos clave en el sitio de unión al receptor (RBS, receptor-binding site por sus siglas en inglés) de la HA del virus de influenza alteran el reconocimiento del receptor. El análisis genético del virus H1N1 que causó la pandemia humana en 1918 mostró que residuos D190 y D225 fueron determinantes clave para una efectiva unión al receptor de tipo humano SA α 2,6. De hecho, una sola sustitución G por D para

el residuo 225 en el RBS altera el patrón de reconocimiento del ácido siálico y también la eficiencia de transmisión del virus. El gen de HA del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 tiene su origen en el linaje porcino, que a su vez se deriva de la cepa pandémica humana de 1918. El nuevo virus H1N1 contiene los aminoácidos D190 y D225 en el RBS de su HA.¹⁴

HA es una molécula monomérica en forma de vara y se ensambla en un trímero que se proyecta hacia fuera como una "espiga" de la membrana viral. Un trímero de HA típico es de aproximadamente 180 a 240 kDa y se mantienen unidos en una estructura espiral enroscada por interacciones hidrofóbicas. Los monómeros de HA son producidos como una sola molécula, HA0, que contiene dos dominios funcionales, HA1 y HA2.¹⁵ La estructura de monómero consiste en una cabeza globular formada por HA1 y una región de tallo "en forma de vara" formado principalmente por HA2 con algunas porciones N-terminales de HA1. Los anticuerpos dirigidos en la región del tallo se han encontrado para inducir una respuesta neutralizante de amplio espectro contra diferentes cepas de virus, incluso a diferentes subtipos de virus de la gripe.¹⁶ HA1 es la responsable de la unión al receptor en la célula huésped y HA2 es esencial para la fusión de membranas. HA es también el principal blanco para el sistema inmune del huésped y se enfrenta a la presión constante de los anticuerpos neutralizantes, en particular, los cuatro sitios antigénicos en HA1, Sa, Sb, Ca y Cb las cuales son los más inmunogénicos entre el virión completo.¹⁷ El sitio Sa consta de 13 aminoácidos involucrados, Sb de 12, Ca de 19 y Cb de 6 (Figura 1).¹⁸

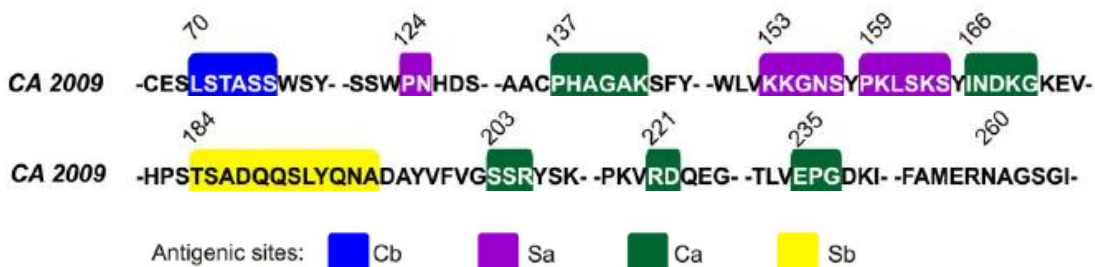


Figura 1. Secuencia de aminoácidos en los sitios antigénicos de la hemaglutinina en la cepa de influenza A/California/07/2009 (CA 2009). Las posiciones de los aminoácidos se encuentran enumeradas y los sitios antigénicos están coloreados: Sa-púrpura, Sb-amarillo, Ca-verde y Cb-azul. Modificado de: De la Rosa-Zamboni y colaboradores.¹⁹

3.3 Variabilidad viral de la HA

La infección por influenza humana se caracteriza por epidemias estacionales y esto se debe a que la influenza A es capaz de mantener su presencia en las poblaciones humanas por adaptaciones evolutivas que dan lugar a mutaciones asociadas con cambios menores en HA o NA. Estas mutaciones resultan en cambios graduales en los antígenos virales que permiten al virus evadir la respuesta inmune.^{20,21} La acumulación de mutaciones en los sitios antigénicos se llama "drift antigénico" (deriva antigénica) y es un proceso importante debido a mutaciones en los sitios de unión a anticuerpos, permitiendo que el virus evite el reconocimiento por los anticuerpos de los huéspedes, que con frecuencia se traduce en epidemias periódicas de influenza.²² A causa de estas mutaciones rápidas, la vacuna de la influenza se debe actualizar cada año a nivel mundial.²¹

La antigenicidad de la HA está influenciada por múltiples factores, incluyendo la acumulación de mutaciones puntuales en el gen que la codifica y la especificidad y avidéz por su receptor.²³ Los cuatro sitios antigénicos

clásicamente definidos en HA son importantes para el reconocimiento de anticuerpos neutralizantes, así, sustituciones de aminoácidos en estos sitios pueden alterar significativamente la antigenicidad viral.²⁴ Recientemente, Koel B. y colaboradores (2013) sugirieron que sustituciones individuales de aminoácidos en uno de los siete residuos próximos cercanos al dominio de unión al receptor de HA fueron responsables de la mayoría de las transformaciones de grupos antigénicos del virus de influenza A(H3N2).²⁵ Del mismo modo, ocho residuos identificados en la HA del virus H1N1pdm permitirían la evasión de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, un cambio antigénico sustancial requiere por lo menos cuatro sustituciones de aminoácidos, ubicados entre dos o más sitios antigénicos diferentes,²⁶ es decir, sustituciones en o cerca del RBS pueden influir en las propiedades antigénicas de los virus de influenza A(H1N1)pdm09 que permiten escapar de la inmunidad de la población.²⁷

Debido a la gran variabilidad de HA, desde el 2011 el árbol filogenético de influenza A(H1N1)pdm09 se dividió en 8 grupos genéticos de acuerdo a las sustituciones de aminoácidos en dicho gen donde la mayoría de los virus predominantes han pertenecido a los grupos 6 y 7 (Figura 2). Los virus del grupo 6, los cuales han circulado mundialmente llevan la sustitución D97N; los virus del grupo 7 principalmente han circulado en Europa, Asia y Oceanía y presentan la sustitución A197T acompañada en la mayoría de los virus por la mutación S143G.²⁸ Actualmente el grupo 6 ha predominado mundialmente y desde septiembre del año 2014 emergió el subgrupo 6B con sustituciones adicionales de aminoácidos en K163Q, A256T y K283E; y dentro del grupo 6B han surgido varios grupos de virus designados como subgrupos 6B.1 con sustituciones en S84N, S162N y I216T y el subgrupo 6B.2 con sustituciones en aminoácidos en V152T y V173I. Debido al predominio del subgrupo 6B.1 en el año 2016, se ha recomendado que se incluya un virus perteneciente a este

subgrupo para que forme parte de la vacuna de influenza estacional del año 2017 para el hemisferio sur.²⁹

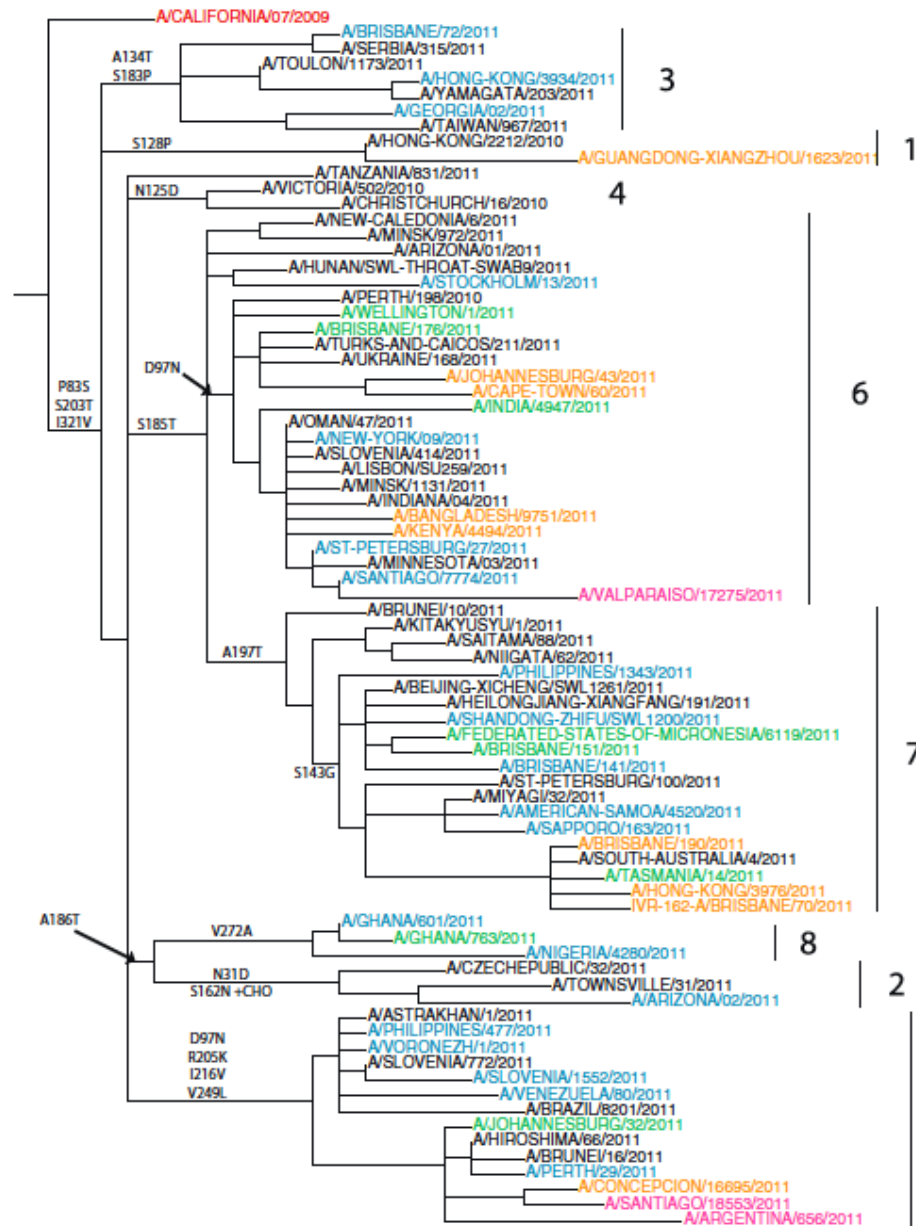


Figura 2. Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos de HA1 del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 representativos de los 8 grupos genéticos. Las sustituciones de aminoácidos están marcadas en los nodos principales. Los virus están coloreados por mes de colección: marzo-abril del 2011 en azul,

mayo del 2011 en verde, junio-julio del 2011 en naranja, agosto del 2011 en rosa. La cepa vacunal actual A/California/07/2009 esta coloreada de rojo.²⁸

3.4 Respuesta inmune en Influenza

La infección causada por el virus influenza es capaz de inducir en el huésped una respuesta inmune innata, así como también una respuesta inmune adaptativa.³⁰ Por lo general, la carga viral es eliminada por la respuesta inmune innata y adaptativa (de tipo celular) dentro de unos días después de la infección, lo que conduce a la recuperación de los hospederos infectados. La respuesta innata es la primera en ser activada y desempeña un papel clave a través de su capacidad de controlar la replicación viral temprana y para promover y regular la respuesta inmune adaptativa específica para el virus.³¹

La primera barrera que el virus encuentra al invadir al huésped es la capa de moco que cubre el epitelio respiratorio y oral; si el virus supera con éxito esta barrera, se puede unir a las células del epitelio respiratorio, ser internalizado y empezar a replicarse.³⁰ La respuesta inmune innata en contra del virus de influenza se caracteriza por un infiltrado de neutrófilos en los pulmones, así como citocinas proinflamatorias. La síntesis de estas citocinas se debe a la activación de las células que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En el caso de virus influenza, los receptores intracelulares TLR7 y TLR8 tienen la capacidad de reconocer RNA de cadena sencilla, activarse y desencadenar una serie de reacciones que culminarán con la síntesis de citocinas proinflamatorias.³² Los neutrófilos no son las únicas células de la inmunidad innata que participan en la respuesta contra los virus influenza; células como las natural killer (NK), los macrófagos y las dendríticas se encuentran de manera considerable en los infiltrados celulares.³³ Como parte de la inmunidad innata están los macrófagos y neutrófilos que no solo tienen la capacidad de fagocitar al antígeno viral, sino también a las células que se

*encuentren infectadas y, de esta manera, procesar los antígenos por la vía endocítica y presentarlos mediante MHC II.*³⁴

*La respuesta al virus influenza varía dependiendo de la cepa. La respuesta a cepas altamente patogénicas es diferente a la respuesta a cepas de moderada patogenicidad; prueba de esto es que el patrón de citocinas generado para cada tipo de virus es diferente. En virus altamente patogénicos predominan IL-6, IL-8, MCP-1 y TNF- α , mientras que en los virus de mediana patogenicidad las citocinas y quimiocinas que se encuentran principalmente expresadas son IP-10, MIG, IL-17 e IFN- γ .*³⁵

*La respuesta adaptativa en sí puede ser dividida en dos sub-componentes críticas: (i) la respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (CTL) que eliminan las células infectadas y así previenen la liberación viral y (ii) la respuesta inmune humoral en la que los anticuerpos producidos en suero y mucosa neutralizan eficazmente el virus.*³¹ *El virus de la influenza tiene la capacidad de estimular una respuesta tanto de linfocitos T CD4 como de linfocitos T CD8; los linfocitos T CD4 son necesarios para una óptima activación de los linfocitos B. La actividad de los linfocitos T no depende de la presencia de los linfocitos B, ya que, aun en casos de influenza en que los pacientes carezcan de linfocitos B, las respuestas específicas de linfocitos T CD4 y T CD8 no se ven afectadas.*³⁶ *La respuesta adaptativa a influenza involucra también la activación de linfocitos B, que después de estar en contacto con el antígeno generarán anticuerpos neutralizantes, estos anticuerpos son los elementos más efectivos contra el virus. Los anticuerpos principalmente de tipo IgG participan en la neutralización del virus a través de distintos mecanismos. Los anticuerpos dirigidos al sitio de unión al receptor en la cabeza globular de HA, inhiben la fijación del virus a los receptores de superficie celular. Por el contrario, los anticuerpos dirigidos al*

tallo de HA median la neutralización del virus al inhibir la fusión del virus y la membrana celular del huésped.³⁷

Es importante tener en cuenta que, durante una infección primaria por influenza, las respuestas innatas y celulares desempeñan un papel clave en la eliminación del virus debido que están presentes entre los días 1-2 después de la infección mientras que los anticuerpos neutralizantes se generan más tarde entre los días 18-21 y cumplen un papel significativo cuando la carga viral es alta y sostenida y pueden permanecer³¹ detectables durante al menos 1.5 años a un título constante por encima del umbral de protección³⁸ y prevenir la reinfección para la misma cepa, así como de variantes a través de reacción cruzada. La respuesta primaria de los CTL es detectable en la sangre después de 6-14 días, mientras que los picos de respuesta de anticuerpos neutralizantes de 4-6 semanas. Fundamentalmente, la respuesta de los CTL decrece después de la eliminación del virus, desaparece en el día 21 después de la infección y es seguido por un estado de "memoria" inmunológica con las células T específicas de antígeno.³¹

3.5 Inmunidad inducida por la vacunación

Las vacunas de influenza inactivadas han estado en producción y en uso desde la década de 1940 y son el tipo más común de las vacunas producidas y utilizadas. Estas vacunas contienen principalmente proteínas de HA y NA con algo de proteína NP con o sin un adyuvante.³⁷ Las vacunas de virus inactivados contienen tres tipos de HA, una cepa viral de subtipo AH1, una cepa de subtipo AH3 y una de influenza tipo B.³⁹

La vacunación con virus inactivados resulta en respuestas inmunitarias locales y sistémicas. Los aumentos de respuesta de anticuerpos en suero ocurren de 2-6 días después de la vacunación con picos aproximadamente 2

semanas después de ésta cuando el 90% de los vacunados tienen títulos de anticuerpos protectores.⁴⁰ La cinética de anticuerpos inducidas por vacunas de influenza inactivadas son diferentes a la inducida por infección natural.³⁸ La durabilidad de las respuestas de anticuerpos no está clara pero la respuesta disminuye con el tiempo y generalmente son dos veces inferior seis meses después de la vacunación.⁴⁰

La dosis clínica normal, que por lo general no excede de 15 µg de proteína HA, induce títulos de anticuerpos neutralizantes, pero generalmente fallan para inducir las respuestas celulares, independientemente de la vía de administración.⁴⁰ La respuesta de anticuerpos séricos está dominada por la IgG, particularmente IgG1, con menores concentraciones de IgM e IgA. Las células secretoras de anticuerpos específicos de influenza aparecen en la circulación aproximadamente siete días después de la vacunación y se componen principalmente de IgG e IgA. En adultos sanos, un número elevado de células secretoras de anticuerpos específicos de influenza están presentes en la mucosa nasal, pero se mantienen estables después de la vacunación. Sin embargo, se observa un aumento transitorio rápido de células secretoras de anticuerpos específicos de influenza en amígdalas y sangre periférica después de la vacunación parenteral.³⁷

Las respuestas de células T CD4+ y CD8+ son menos conocidas. Ensayos clínicos que investigan la inducción de células T CD8+ específicas de antígeno después de la vacunación han reportado resultados sin ningún aumento en CD8+, IFN-γ y células T después de la vacunación en adultos o niños mientras que otros investigadores han encontrado un aumento en CD8+, IFN-γ y células T después de la vacunación específica a la proteína HA. Las células T CD4+ desempeñan un papel clave en la inmunidad contra influenza, tanto en muerte directa a través de mecanismos intrínsecos y al estimular las células del sistema inmune innata o adaptativa. A diferencia de las células T

CD8+, la respuesta de las células T CD4+ cooperadoras aumentan después de la vacunación, aunque la durabilidad de esta respuesta no es clara.³⁷

3.6 Cartografía antigénica como herramienta para determinar la variabilidad del virus de influenza

La medición precisa de la historia de exposición de individuos a patógenos es una herramienta esencial para comprender los factores de riesgo a la infección y los patrones de transmisión en la población. Determinado a través de una variedad de métodos, la concentración de anticuerpos en suero se considera el método estándar de oro utilizado para estimar una exposición pasada a patógenos, para la caracterización antigénica de un virus y en estudios de seroprevalencia.^{41, 42} Uno de los métodos más comunes para medir el anticuerpo sérico contra el virus de influenza es el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA). La prueba de IHA, es rápida, relativamente fácil de realizar, es considerada fácil de estandarizar y reproducir a través de los laboratorios. La capacidad de la HA del virus de influenza para aglutinar eritrocitos mediante la unión a receptores de ácido siálico en la superficie de las células es susceptible a la inhibición por anticuerpos específicos y es la base del ensayo de IHA;⁴³ además, se ha establecido una correlación de protección en los títulos séricos de ensayo de IHA en seres humanos.⁴²

Los datos de la IHA pueden ser analizados más a fondo mediante el uso de métodos más visuales y computacionales, tales como la cartografía antigénica. Con la cartografía antigénica podemos cuantificar y visualizar las diferencias antigénicas entre los virus en un mapa antigénico de dos o tres dimensiones basado en conjuntos de datos inmunológicos de tal manera que virus similares se agrupan estrechamente en el mapa, mientras que los virus que son antigénicamente diferentes se encuentran más lejos.⁴⁴⁻⁴⁷ Una buena cartografía antigénica puede facilitar la selección de cepas de la vacuna de

influenza e identificar variantes antigénicas debido a que puede simplificar la interpretación de datos a través del mapa antigénico intuitivo.⁴⁵ Actualmente la cartografía antigénica se ha convertido en una herramienta estándar en la vigilancia de influenza de los laboratorios de referencia de la OMS.⁴⁸

La cartografía geográfica es una técnica común para mostrar las ciudades y sus distancias geográficas en un mapa. Esta cartografía se puede generar utilizando el método de ajuste multidimensional (MDS, multidimensional scaling por sus siglas en inglés) basado en una matriz de distancia geográfica. Como un análogo de la cartografía geográfica, la cartografía antigénica de influenza mapea los antígenos de influenza en un mapa basado en la matriz de distancia generado utilizando los títulos de anticuerpos de los ensayos de IHA.⁴⁵ En este modelo, a los virus y sueros se les dan ubicaciones N-dimensionales, especificando así un mapa antigénico, de tal manera que las distancias entre los virus y sueros en este espacio son inversamente proporcionales a la reactividad cruzada; en el modelo, la distancia de una unidad antigénica en el mapa se traduce como una disminución doble en el título de anticuerpos entre el virus y los sueros. En el fondo, estos ensayos comparan la reactividad de una cepa de virus contra anticuerpos generados por otra cepa a través de la infección o la vacunación. En cualquier caso, los títulos de anticuerpos representan un factor de dilución el cual aumenta en el suero mientras más anticuerpos se encuentren presentes. Estos factores se evalúan comúnmente mediante diluciones en serie, por lo que los títulos de anticuerpos formarán series logarítmicas (ej. 40, 80, 160). Para facilitar la manipulación de los datos, se ha encontrado conveniente normalizar los datos a \log_2 , es decir $H_{ij} = \log_2$, en donde i representan el título del virus, j el suero.⁴⁹ Dada la combinación de matriz de los títulos de anticuerpos con m antígenos (cepas del virus influenza) y n antisueros (sueros de pacientes), la matriz de datos se puede representar con el algoritmo $M_{m \times n} = (m_{ij})_{m \times n}$, donde m_{ij} denota los valores de títulos de anticuerpos a partir de la reacción entre la prueba de antígeno i y el antisuero

j.⁴⁵ Además, el método computacional MDS para esta herramienta se encuentra desarrollado en la plataforma informática Java y utiliza Jmol (visor de estructuras químicas en tercera dimensión).⁴⁸

En un cartograma antigénico, ambos ejes vertical y horizontal representan la distancia antigénica expresada en unidades donde se representan las cepas virales de interés y los títulos de anticuerpos. El espaciado entre líneas de la cuadrícula es igual a 1 unidad de distancia antigénica, por cada dilución doble.⁴⁷ Si la distancia antigénica entre dos cepas es menor o igual a 4 unidades, quiere decir que antigénicamente son similares y por el contrario si esta distancia antigénica es mayor a cuatro unidades las cepas son antigénicamente diferentes.⁴⁹

3.7 Situación de la Influenza A en Yucatán

La influenza es un problema grave de salud pública con epidemias anuales que causan en todo el mundo unos 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave y unas 250,000 a 500,000 muertes. En los climas templados las epidemias estacionales se producen sobre todo durante el invierno, mientras que en las regiones tropicales pueden aparecer durante todo el año, produciendo brotes más irregulares.¹ En zonas tropicales la evidencia de estacionalidad es más difícil de obtener, aunque la actividad es más probable durante estaciones lluviosas y húmedas.³ En Yucatán, localizado geográficamente en la zona tropical, la presencia de casos está presente de diciembre a julio, en un patrón diferente a zonas templadas donde el pico de incidencia ocurre durante el otoño e invierno³ principalmente entre los meses de noviembre a marzo como ocurre en el centro del país.⁴

Recientemente Ayora G. y colaboradores (2017), analizando datos virológicos de período 2010-2014 y de mortalidad del período 1998-2014 de la

ciudad de México y de los 31 estados del país a través del software Epiptoi (estadísticos descriptivos y análisis espacio-temporales) demostraron que la ocurrencia de los picos primarios (principales) de los datos virológicos y de mortalidad están bien alineados con el invierno del hemisferio norte (diciembre-febrero) y con el programa de vacunación. Sin embargo, en los tres estados de la Península de Yucatán (Campeche, Quintana Roo y Yucatán) los picos de casos de influenza ocurrieron en septiembre mientras que los picos de mortalidad relacionados a influenza ocurrieron en septiembre para Quintana Roo y Yucatán y en el mes de mayo para Campeche, es decir la ocurrencia de casos de influenza en el resto del país coincide con el invierno mientras que en la Península de Yucatán la estacionalidad de la influenza específicamente se apartó sustancialmente de los patrones del hemisferio norte, lo cual es similar a lo que se ha observado en otras regiones tropicales a nivel mundial.⁵⁰

Actualmente Yucatán se ha encontrado en los primeros lugares a nivel nacional de casos confirmados de influenza como en los años 2013, 2014 y 2016 donde los subtipos más predominantes fueron A(H1N1)pdm09, A(H3N2) e influenza A no subtipificado. A pesar de la importancia epidemiológica de la influenza en Yucatán aún no se cuenta con un panorama representativo de la actividad, mucho menos existen estudios serológicos que puedan dar información relevante acerca del estado inmune de la población con el riesgo a enfermarse.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09, su relación con la frecuencia de influenza estacional en Yucatán y con la variación antigénica durante el período 2013-2016.

4.2 Objetivos específicos

- *Determinar los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 en una muestra de sueros residuales colectados durante el período 2013-2016.*
- *Definir la relación entre los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 y la frecuencia de influenza estacional en Yucatán durante el período 2013-2016.*
- *Identificar la relación antigénica entre los virus aislados en el año 2013 y 2016 con respecto a la cepa vacunal A/California/07/2009.*
- *Evaluar la relación antigénica entre los anticuerpos detectados en sueros de humano colectados del período 2013-2016 y virus de influenza A(H1N1)pdm09 de referencia y aislados en el año 2013 y 2016.*

V. HIPÓTESIS

Los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 determinados en los sueros de humano colectados durante el período de 2013-2016, se relacionan con la frecuencia de influenza estacional en Yucatán y con la variación antigénica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

El presente trabajo es un estudio de carácter ambispectivo⁵¹, descriptivo y observacional.

Para realizar el análisis retrospectivo se seleccionaron de manera aleatoria muestras de suero residual del banco de sueros del Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Yucatán del período 2013-2015, con los cuales se determinó la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza.

Para el análisis prospectivo se recolectaron muestras de suero residual y de exudado faríngeo del año 2016 proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Yucatán para cada uno de los meses del año.

Debido a que son muestras que pertenecen al banco de sueros de Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Yucatán y para asegurar la protección de datos no se tuvo acceso a información personal del paciente.

6.2 Muestra

Suero residual

Las muestras de suero residual forman parte del control de calidad para VIH de pacientes donadores de sangre enviados por las instituciones de salud a la dependencia. Estas muestras son confirmadas con resultado negativo a VIH por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Yucatán. Las muestras son colectadas en cada uno de los meses durante el transcurso de los años.

El tamaño de muestra se calculó de acuerdo a variables cualitativas donde se conoce el universo y el valor $p(0.05)$.⁵² Se utilizó la fórmula para hallar

el tamaño de muestra en estudios descriptivos⁵³ donde se conoce la prevalencia, proporción o porcentaje del fenómeno estudiado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(Z\alpha)^2(p)(q)}{\delta^2}$$

Donde:

N = Tamaño de la muestra que se requiere

$Z\alpha$ = Distancia de la media del valor de la significación propuesto.

p = Proporción de sujetos portadores del fenómeno en estudio

$q = 1 - p$ (complementario, sujetos que no tienen la variable en estudio).

δ = Precisión o magnitud del error que estamos dispuestos a aceptar ($\pm 3\%$)

De un universo de 3600 muestras de suero residual se seleccionaron un total de 543 muestras, es decir, 181 muestras por año. Como las muestras están identificadas por folios, de cada 6 se seleccionaron aleatoriamente 1 del banco de sueros del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Yucatán del periodo 2013 al 2016. El cálculo del tamaño muestral para los sueros se describe a continuación:

$$Z\alpha = 1.96$$

$$p = 0.15 \text{ (promedio de la prevalencia 15 \%)}$$

$$q = 1 - 0.15 = 0.85$$

$$\delta = 0.03$$

$$N = \frac{(1.96)^2(0.15)(0.85)}{0.03^2}$$

$N = 543$ muestras de suero.

Exudados faríngeos

Los exudados faríngeos que se utilizaron para el proyecto provienen del banco de exudados faríngeos del Laboratorio Estatal de Salud Pública que llegan como parte de la vigilancia epidemiológica para el programa de influenza.

En base a la prevalencia de influenza A(H1N1) de los últimos años en el estado de Yucatán se calculó el tamaño de la muestra, en donde no se conoce el tamaño del universo. De acuerdo a la estimación, se recolectaron 124 muestras de exudado faríngeo en el año 2016, cuyo cálculo se muestra a continuación:

$$Z\alpha = 1.96$$

$$p = 0.11 \text{ (promedio de la prevalencia 11 \% para virus influenza A(H1N1)pdm09)}$$

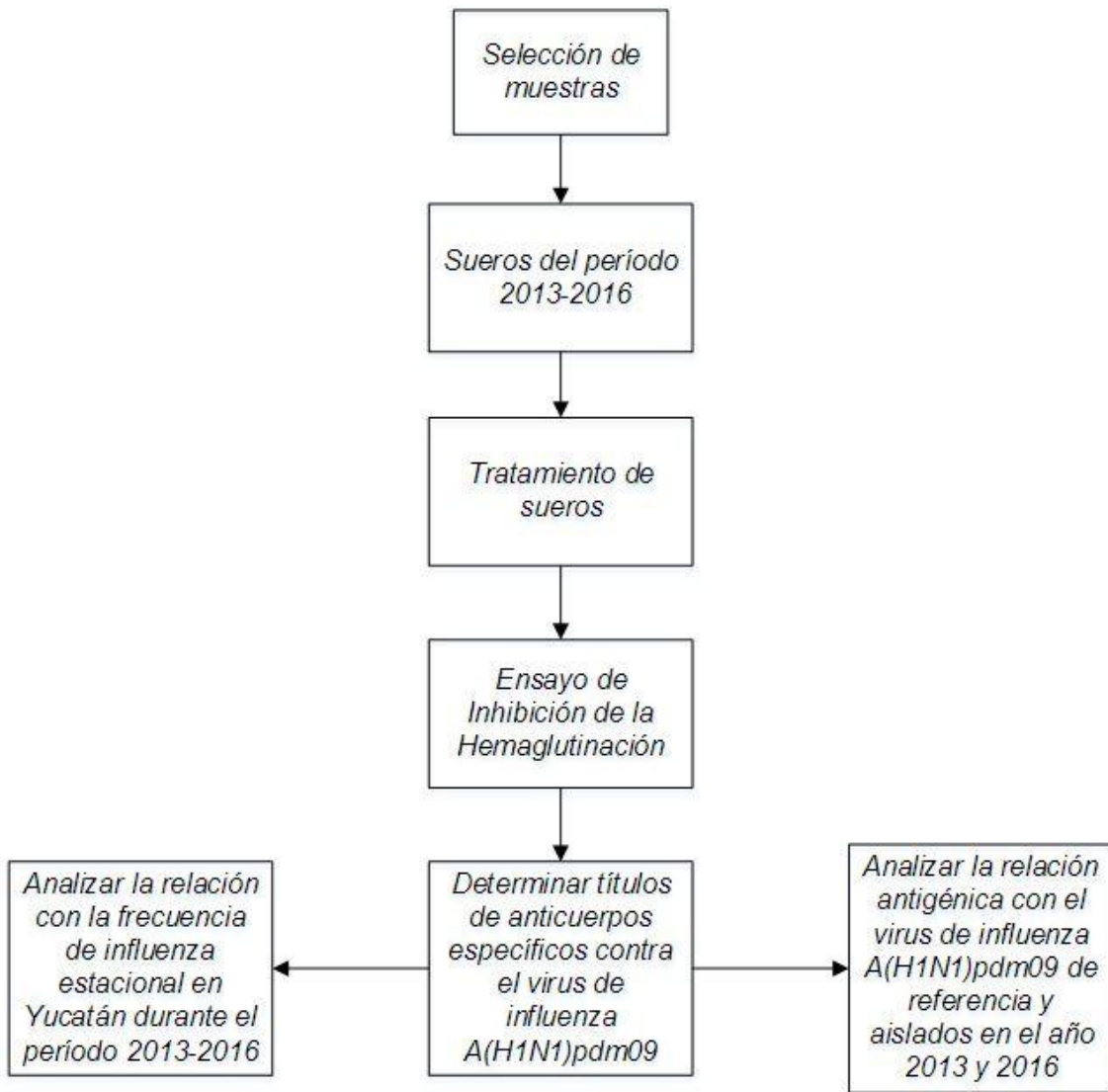
$$q = 1 - 0.11 = 0.89$$

$$\delta = 0.03$$

$$N = \frac{(1.96)^2(0.03)(0.97)}{0.03^2}$$

$$N = \frac{(0.0384)}{0.0009} = 124 \text{ muestras de exudado faríngeo para el año 2016}$$

6.3 Diseño de estudio



6.4 Cepas de Influenza

Las cepas del virus de influenza empleadas en esta investigación fueron A/California/07/2009, A/Yucatán/138/2013, A/Yucatán/152/2013, A/Yucatán/250/2013 y A/Yucatán/12017/2016 proporcionados por el laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”. Estas cepas fueron aisladas utilizando la línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en medio D-MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. El stock viral fue alicuotado y almacenado a -70 °C hasta su uso posterior en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA).

A partir de este apartado del documento los virus de influenza van a ser nombrados como: Cal/07/09 (A/California/07/2009), Yuc/138/13 (A/Yucatán/138/2013), Yuc/152/13 (A/Yucatán/152/2013), Yuc/250/13 (A/Yucatán/250/2013) y Yuc/12017/16 (A/Yucatán/12017/2016).

6.5 Aislamiento viral

El procedimiento consistió en aislar el virus de influenza A(H1N1)pdm09 a partir de muestras de exudado faríngeo. Previamente, células MDCK fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad celular de 1×10^6 células por pozo. Confluyente la monocapa de células, éstas se lavaron dos veces con PBS. A continuación, se adicionó la muestra de exudado faríngeo (100 µl de muestra + 100 µl de D-MEM suplementado con penicilina 10,000 u/ml-estreptomicina 10,000 µg/ml y HEPES 1 M). Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, posteriormente se desechó el inóculo y las células se incubaron con medio D-MEM suplementado con tripsina - TPCK (0.5 µg/ml) a 37 °C con 5 % de CO₂ por 72 horas. Una vez observado el efecto citopático, se colectaron los sobrenadantes, se alicuotaron y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.6 Ensayo de hemaglutinación

Para confirmar la presencia de virus en los sobrenadantes colectados se realizó un ensayo de hemaglutinación. En placas de 96 pozos de fondo U, se colocó en el primer pozo de la placa 100 µl del stock y se realizaron diluciones dobles seriadas en 50 µl de PBS. Posteriormente, se adicionó 50 µl de una solución de eritrocitos de pavo al 0.5 % y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. El título de hemaglutinación correspondió a la última dilución del stock que indicara aglutinación.

6.7 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

La determinación de anticuerpos específicos contra el antígeno del virus de influenza A(H1N1)pdm2009 se realizó mediante un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA) de acuerdo al manual de procedimientos de la OMS.⁵⁴

Tratamiento de los sueros

Los sueros de los pacientes fueron tratados con una suspensión de kaolín para remover los inhibidores hemaglutinantes naturales y con eritrocitos de pavo para remover las aglutininas inespecíficas. El tratamiento de los sueros con kaolín consistió en adicionar en un tubo 0.4 ml de borato salino, 0.1 ml del suero del paciente y 0.5 ml de la suspensión de kaolín; la mezcla se agitó en vórtex por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante quedó diluido a una concentración 1:10 del suero original. Para remover las aglutininas específicas se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió 10 µl del paquete de eritrocitos de pavo, se mezcló suavemente y se mantuvo en refrigeración por 20 minutos; posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos en centrífuga refrigerada y finalmente se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo listo para el ensayo de IHA.

Preparación del antígeno estandarizado con 4 UHA

De acuerdo al manual de la OMS,⁵⁴ una unidad hemaglutinante (1 UHA) corresponde a la última dilución del virus que indicó hemaglutinación. Para obtener la dilución de virus que contenga 4 UHA se realiza el siguiente cálculo, el título de HA del virus se divide entre 8 para obtener 8 UHA en 50 µl. Debido a que el ensayo de IHA se realiza con 25 µl de la dilución de virus esto nos da una concentración final de 4 UHA.

Una vez tratados los sueros y los virus estandarizados a 4 UHA, se procedió a realizar el ensayo de IHA. En placas de 96 pozos con fondo en “U”, se añadieron 50 µl de cada uno de los sueros tratados y se realizaron diluciones seriadas en 25 µl de PBS. A continuación, se añadió a todos los pozos 25 µl de dilución de virus con 4 UHA y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, se añadió a cada pozo 50 µl de solución de eritrocitos de pavo al 0.5% y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. El título de IHA es recíproco a la dilución más alta de suero que inhibe la hemaglutinación. De acuerdo al manual de procedimientos de la OMS un título de anticuerpos $\geq 1:40$ se considera que proporciona inmunidad, es decir un título de IHA igual o superior a 1:40 en el suero sanguíneo se considera protector contra el virus de influenza.

6.8 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) para la amplificación del gen HA

Se realizó una RT-PCR en un solo paso utilizando el Kit comercial Access Quick RT-PCR de Promega,⁵⁵ siguiendo las instrucciones del proveedor, donde la mezcla de reacción contenía primers a una concentración final de 10 µM (Cuadro 1), AccessQuick Master Mix 1X, 5U de transcriptasa

reversa AMV y un templado de ARN viral de 1pg – 1µg en reacciones con un volumen final en agua de 25 µl.

Se amplificaron tres fragmentos que sobrelapados corresponden al tamaño del gen completo de la HA.

Cuadro 1. Primers utilizados para obtener el gen HA completo (OMS, 2009).

Iniciador	Secuencia	Tamaño
HA 1 Fw	TGTAAAACGACGGCCAGT ATACGACTGCAAAAAGCAGGG	440 pb
HA 441 Rv	CAGGAAACAGCTATGACCTC ATGATTGGGCCATGA	
HA 379 Fw	TGTAAAACGACGGCCAGT ACATGTTACCCAGGRGATTTTC	861 pb
HA 1240 Rv	CAGGAAACAGCTATGACCTC TTTTACCTACTGCTGTGAA	
HA 1124 Fw	TGTAAAACGACGGCCAGT TGGATGGTACGGTTATCACCA	654 pb
HA 1778 Rv	CAGGAAACAGCTATGACCG TGTTCAGTAGAAACAAGGGTGT	

*La secuencia de nucleótidos resaltados en negrita corresponden a los primers universales M13 forward y reverse.

Las condiciones de la amplificación se indican en el Cuadro 2. Los fragmentos amplificados se corroboraron en geles de agarosa al 1% con Buffer TAE 1X teñidos con SYBER SAFE⁵⁶ y un marcador de peso molecular de 1 Kb de Bio Labs.

Cuadro 2. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen HA por RT-PCR.

Ciclos	Temperatura y tiempo	Proceso
1 ciclo	48°C por 45 min.	Transcripción reversa
1 ciclo	94°C por 2 min.	Desnaturalización inicial
40 ciclos	94 °C por 20 seg	Desnaturalización
	50°C por 30 seg.	Acoplamiento
	72 °C por 1 min.	Extensión
1 ciclo	72°C por 7 min.	Extensión final

Los amplicones fueron purificados utilizando Qiagen QIAquick PCR Purification Kit siguiendo las instrucciones del proveedor.⁵⁷ Posteriormente se

realizó la cuantificación utilizando el Nanodrop Lite Spectrophotometer de Thermo Scientific con el fin de determinar la concentración de ADN de cada fragmento.

6.9 Secuenciación

Las muestras en las que se lograron amplificar los fragmentos de PCR correspondientes a la secuencia completa del gen HA fueron enviadas al Instituto de Genómica de la Universidad de Clemson para ser secuenciadas utilizando primers universales M13.

6.10 Análisis de las secuencias

Se utilizó el programa Geneious 6.1.6 para analizar la calidad de las secuencias y llevar a cabo el sobrelapamiento de las secuencias F y R, uniendo los fragmentos con el fin de obtener secuencias consenso del gen HA de cada una de las muestras (Figura 3).

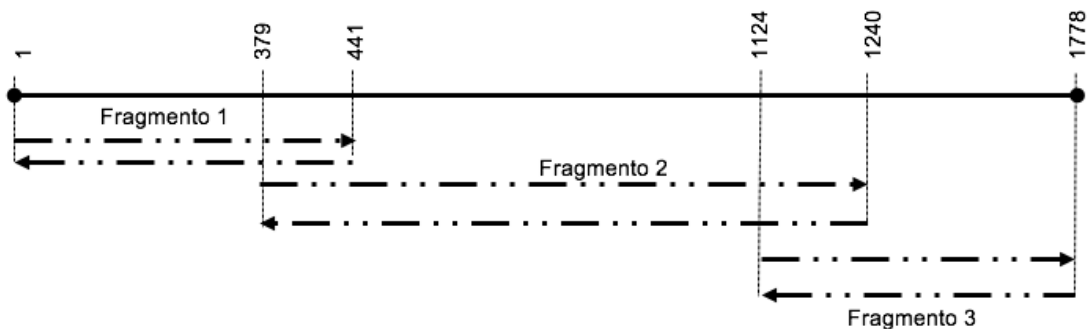


Figura 3. Mapa de sobrelapamiento de los fragmentos que conforman el gen HA completo.

Posteriormente se realizó una búsqueda en la base de datos de influenza perteneciente al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para obtener la secuencia de nucleótidos de la HA de la cepa de referencia

Cal/07/09 (23308115) y comparar con las secuencias obtenidas de las muestras de exudado faríngeo del 2016.

6.11 Cartograma antigénico

El cartograma antigénico se realizó con la aplicación gratuita llamada Antigenic Cartography Software de ACMACS.⁵⁸ Los cartogramas antigénicos se visualizan en dos ejes x, y (horizontal y vertical) los cuales representan distancias antigénicas. Además, el espacio entre cada cuadrícula corresponde a 1 unidad de distancia antigénica, es decir, una dilución doble seriada en el ensayo IHA (1:10 hasta 1:1280); las cepas virales de influenza A(H1N1)pdm09 se muestran en forma de círculos mientras que los sueros de los pacientes del período 2013-2016 en forma de cuadros.⁴⁹

De acuerdo a los criterios de la OMS para determinar si un virus es similar antigénicamente a la cepa de referencia, la distancia antigénica debe ser menor o igual a 4 unidades, lo cual significa que antigénicamente son similares mientras que si esta distancia antigénica es mayor a cuatro unidades las cepas son antigénicamente diferentes. Por otra parte, para establecer que los anticuerpos contenidos en una muestra de suero corresponden antigénicamente contra la cepa con la que se está evaluando es necesario que existan ≤ 5 unidades antigénicas entre ambos.⁴⁹

VII. RESULTADOS

Con base al cálculo del tamaño de muestra, se seleccionaron de manera aleatoria y homogénea 180 muestras de suero residual en cada año, con excepción del 2013 que solo fue posible seleccionar 75 muestras correspondientes a los meses de junio a octubre (Figura 4). A un total de 615 muestras de suero se les realizó ensayos de IHA para la determinación de los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09.

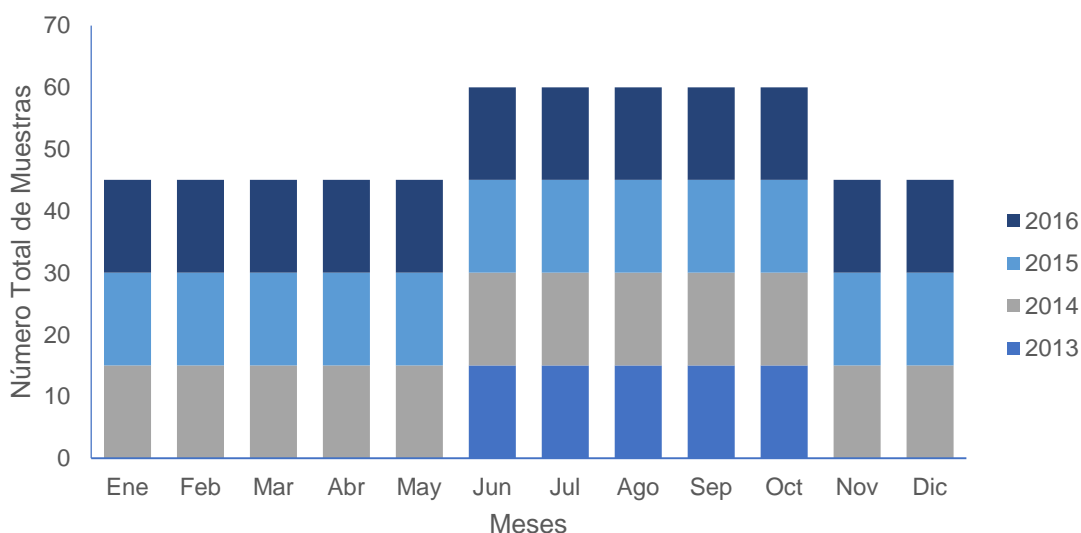


Figura 4. Distribución en tiempo del número de muestras de suero residual proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Todas las muestras de suero recolectadas del período 2013-2016 fueron evaluadas contra la cepa de referencia Cal/07/09; adicionalmente, las muestras del año 2013 se evaluaron contra las cepas Yuc/138/13, Yuc/152/13 y Yuc/250/13; mientras que las muestras de los años 2014, 2015 y 2016 se evaluaron contra la cepa Yuc/12017/16. En general, los títulos de IHA para todas las muestras de suero analizadas se encontraron en el rango de 1:10 hasta 1:1280 (Cuadro 3).

Cuadro 3. *Número de muestras que tuvieron títulos de IHA por año y respecto a todas las cepas de virus A(H1N1)pdm09 utilizadas en este estudio.*

Título de IHA	Año 2013* (%)	Año 2014** (%)	Año 2015** (%)	Año 2016** (%)
< 1:10	32 (10.7)	9 (2.5)	16 (4.4)	20 (5.6)
1:10	64 (21.3)	48 (13.3)	33 (9.2)	40 (11.1)
1:20	47 (15.7)	56 (15.6)	92 (25.6)	64 (17.8)
1:40	66 (22.0)	68 (18.9)	78 (21.7)	71 (19.7)
1:80	48 (16.0)	80 (22.2)	66 (18.3)	71 (19.7)
1:160	29 (9.7)	45 (12.5)	42 (11.7)	43 (11.9)
1:320	10 (3.3)	39 (10.8)	24 (6.7)	29 (8.1)
1:640	4 (1.3)	12 (3.3)	5 (1.4)	8 (2.2)
1:1280	0 (0.0)	3 (0.8)	4 (1.1)	14 (3.9)

**Para el año 2013, los datos corresponden a la sumatoria de los títulos de IHA de las 75 muestras analizadas con las cuatro cepas de influenza (n = 300).*

***Para los años 2014-2016 los datos corresponden a la sumatoria de los títulos de IHA de las 180 muestras analizadas con las dos cepas de influenza (n = 360).*

De acuerdo a los parámetros de la OMS, aquellos sueros de pacientes con títulos de anticuerpos $\geq 1:40$ indican protección contra los virus de influenza. En general, los resultados del ensayo de inhibición de la hemaglutinación mostraron que en más del 60 % de todas las muestras analizadas se detectaron títulos de anticuerpos protectores independientemente de la cepa de influenza utilizada.

Los títulos de anticuerpos obtenidos en los ensayos de IHA para las muestras de suero del año 2013 contra las cepas Cal/07/09, Yuc/138/13, Yuc/152/13 y Yuc/250/13 mostraron una distribución normal al ser comparadas entre sí, indicando que el porcentaje de sueros para cada una de las diluciones fue similar entre cepas, con algunas diferencias mínimas. Es interesante la observación de que la distribución normal está dada por las diluciones 1:10

hasta 1:80 con el mayor número de muestras, y un decremento a partir de la dilución 1:160 hasta 1:640 (Figura 5).

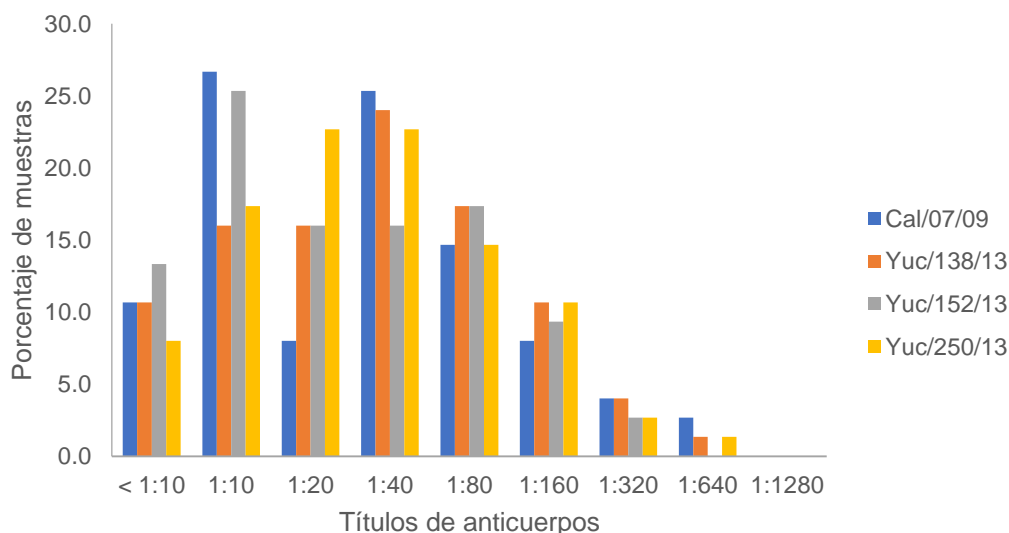


Figura 5. Distribución de los títulos de anticuerpos de las muestras de suero del año 2013 ($n = 75$) respecto a las cepas de virus A(H1N1)pdm09.

Al analizar de manera individual los títulos de anticuerpos para cada virus se encontró que el número de muestras de suero con títulos de anticuerpos protectores fue mayor al 50 % para las cepas Cal/07/09, Yuc/138/13 y Yuc/250/13 (Cuadro 4). En contraste, con respecto a la cepa Yuc/152/13 se encontró que más del 50 % de las muestras analizadas no poseen títulos de anticuerpos protectores.

Cuadro 4. Número de muestras de suero con títulos de anticuerpos protectores contra los virus de influenza A(H1N1)pdm09.

	Cal/07/09 (%)	Yuc/138/13 (%)	Yuc/152/13 (%)	Yuc/250/13 (%)
Títulos ≥ 40	41 (54.7)	43 (57.3)	34 (45.3)	39 (52)
Títulos < 40	34 (45.3)	32 (42.7)	41 (54.7)	36 (48)
Total	75 (100)	75 (100)	75 (100)	75 (100)

Mediante la prueba de ANOVA ($p < 0.05$) no se identificaron diferencias significativas entre el número de sueros con títulos protectores ($p = 0.8781$) y no protectores ($p = 0.2049$) sin embargo, se apreció que la cepa Yuc/152/13 tuvo una media menor con respecto a las demás y la mayoría de los datos se registraron por debajo del título 1:160 (Figura 6).

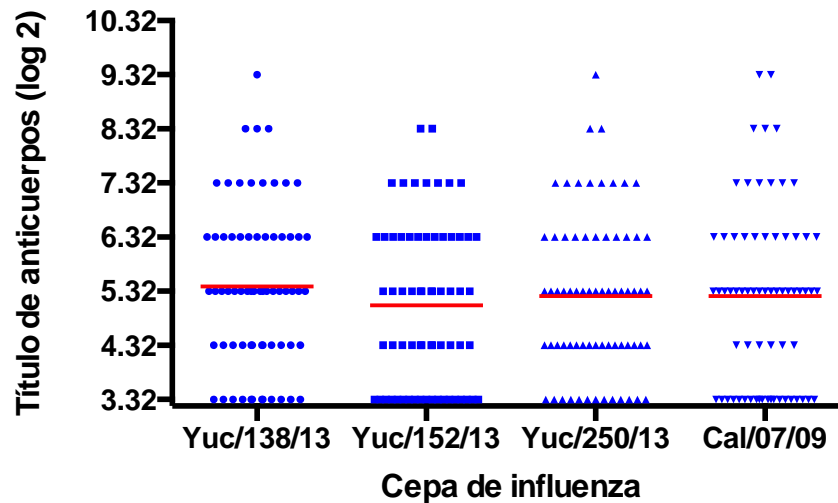


Figura 6. Representación gráfica del análisis de ANOVA para las muestras de suero del año 2013. Los símbolos de color azul corresponden a cada una de las muestras que poseen títulos de anticuerpos contra las diferentes cepas de influenza A(H1N1)pdm09; la franja de color rojo representa la media. La media para cada cepa analizada fue 5.41 para Yuc/138/13, 5.06 para Yuc/152/13, 5.23 para Yuc/250/13 y 5.23 Cal/07/09, mientras que la desviación estándar para cada cepa fue 1.49, 1.49, 1.46 y 1.64 respectivamente.

Con respecto al año 2014, fue muy similar a lo observado para el año anterior, los títulos de anticuerpos obtenidos mostraron una distribución normal cuando fueron agrupados. El mayor número de muestras se centró en las diluciones que indicaron títulos de anticuerpos de 1:20, 1:40 y 1:80 para ambas cepas de influenza, y a diferencia del año 2013, se registraron muestras con

resultado de IHA hasta en la última dilución de 1:1280. Los resultados indicaron que el 60 % de los sueros analizados tenían títulos de anticuerpos protectores \geq 1:40 para la cepa de referencia Cal/07/09 y el 77 % para la cepa Yuc/12017/16 (Figura 7).

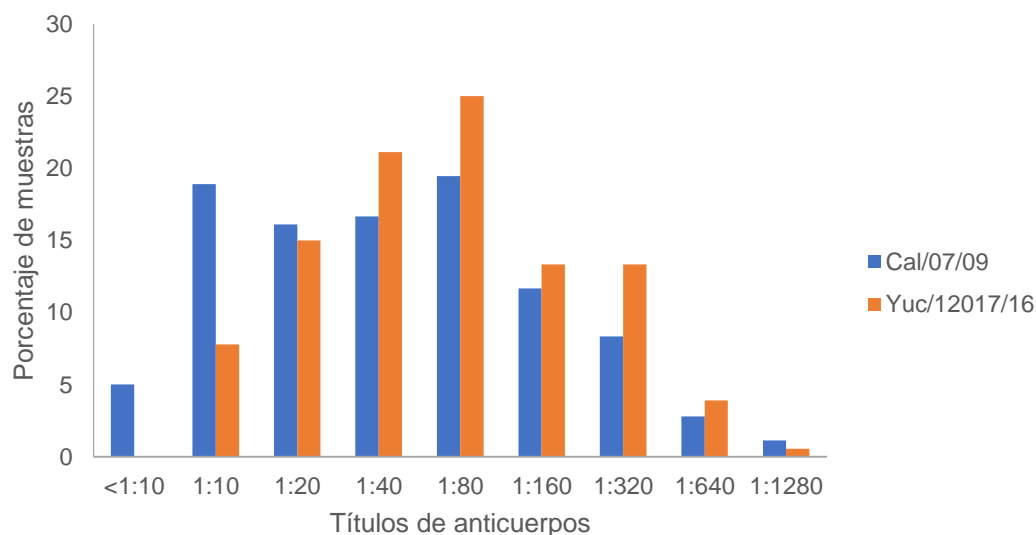


Figura 7. Distribución de los títulos de anticuerpos respecto a las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16 para las muestras de suero del año 2014 ($n = 180$).

Se realizó un análisis estadístico (*t* de student) para muestras no pareadas y no se encontraron diferencias significativas al comparar los dos grupos ($p = 0.1968$). En la Figura 8 se muestran los resultados, como se puede observar la media de los títulos de anticuerpos para ambas cepas fue similar y el concentrado de datos de observa por debajo de los títulos de 1:160. Además, el 47.77 % de las muestras con títulos de IHA protectores contra Cal/07/09 y el 59.44 % con títulos protectores contra Yuc/12017/16 se encuentran cercanos a la media, y solo unas pocas muestras están por arriba de la desviación estándar.

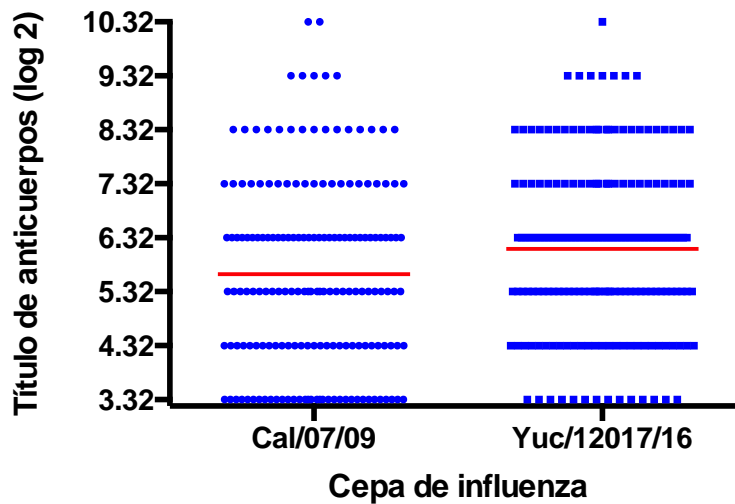


Figura 8. Representación gráfica del análisis de la prueba *t* del número de muestras del año 2014 con títulos de anticuerpos en los ensayos de IHA contra las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16. Los símbolos de color azul corresponden a cada una de las muestras que poseen títulos de anticuerpos contra las diferentes cepas de influenza A(H1N1)pdm09; la franja de color rojo la media. La media y desviación estándar para la cepa Cal/07/09 son 5.64 y 1.76 mientras que para Yuc/12017/16 es 6.11 y 1.60 respectivamente.

Al graficar los títulos de anticuerpos de las muestras analizadas del año 2015 con respecto a las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16, se observó el mismo comportamiento de distribución normal de los años anteriores. Sin embargo, se puede observar que el pico máximo de la curva está centrado en los títulos 1:20, 1:40 y 1:80 con una disminución progresiva hacia los títulos de IHA mayores, semejante para ambas cepas de influenza. Estos resultados indican que el 64 % de los sueros analizados tenían títulos de anticuerpos protectores \geq 1:40 para la cepa de referencia Cal/07/09 y del 58 % para la cepa Yuc/12017/16 (Figura 9).

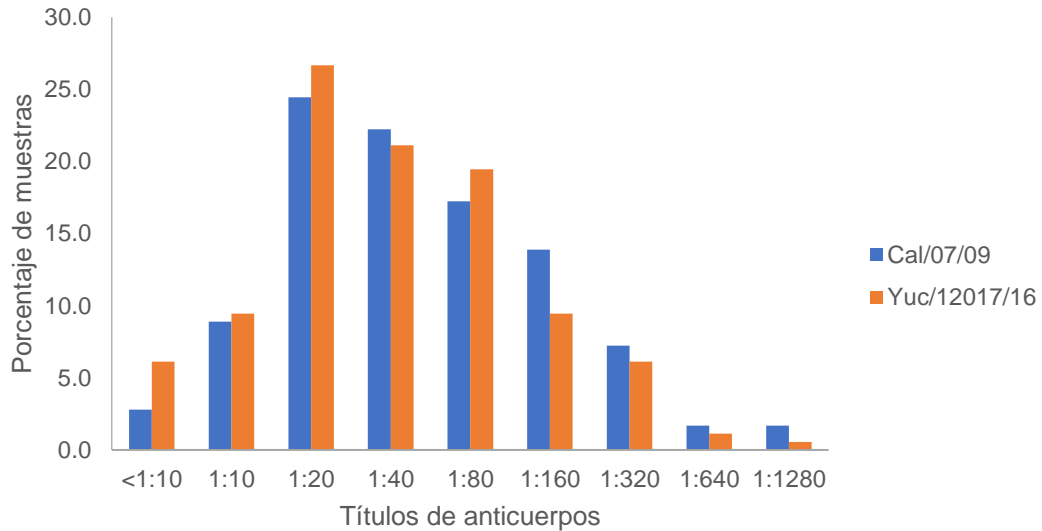


Figura 9. Distribución del número de muestras de suero del año 2015 ($n = 180$) que poseen títulos de anticuerpos contra las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16 en los ensayos de IHA.

A través del análisis estadístico para muestras no pareadas no se encontraron diferencias significativas al comprar ambos grupos ($p = 0.1236$) (Figura 10). Podemos observar en la Figura 10 que el 53.33 % de las muestras con títulos de IHA protectores contra Cal/07/09 y el 50 % con títulos protectores contra Yuc/12017/16 se encuentran cercanos a la media, y solo unas pocas muestras están por arriba de la desviación estándar.

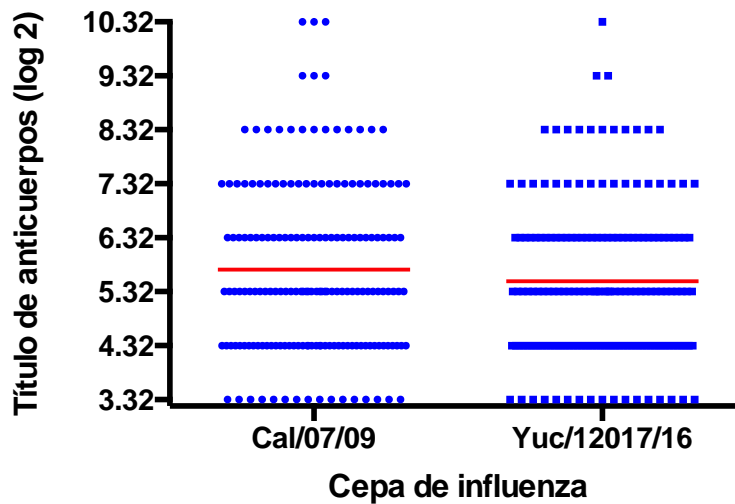


Figura 10. Representación gráfica de la prueba *t* del número de muestras del año 2015 con títulos de anticuerpos en los ensayos de IHA contra las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16. Los símbolos de color azul corresponden a cada una de las muestras que poseen títulos de anticuerpos contra las diferentes cepas de influenza A(H1N1)pdm09; la franja de color rojo representa la media. La media y desviación estándar para la cepa Cal/07/09 son 5.72 y 1.60 mientras que para Yuc/12017/16 es 5.51 y 1.48 respectivamente.

Finalmente, al graficar los títulos de IHA de las muestras del 2016 estos mostraron el mismo comportamiento de distribución normal con algunas diferencias entre las cepas, en donde para la cepa de referencia Cal/07/09 el 40 % de los títulos de IHA fueron no protectores (<1:10 a 1:20) mientras que para la cepa Yuc/12017/16, solo el 28 % fueron no protectores. Así mismo, a diferencia de los resultados de años anteriores, se notó un incremento en las muestras de suero con títulos de IHA de 1:620 y 1:1280 (Figura 11).

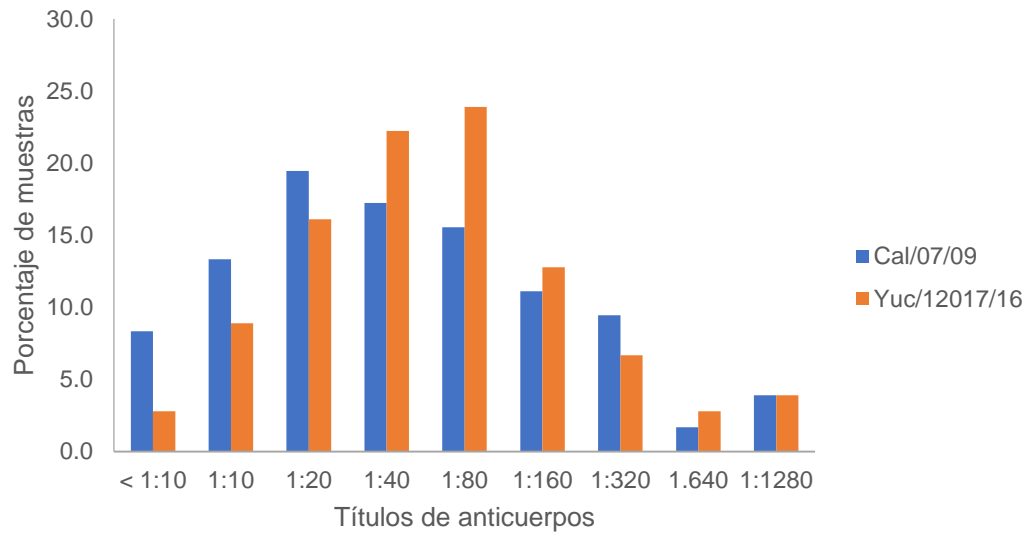


Figura 11. Distribución del número de muestras de suero del año 2016 ($n = 180$) que poseen títulos de anticuerpos contra las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16 en los ensayos de IHA.

A través de la prueba t para muestras no pareadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.7577$) entre el número de muestras con títulos de anticuerpos contra las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16 (Figura 12). Podemos observar en la figura que el 43.88 % de las muestras con títulos de IHA protectores contra Cal/07/09 y el 58.88 % con títulos protectores contra Yuc/12017/16 se encuentran cercanos a la media, y solo unas pocas muestras están por arriba de la desviación estándar.

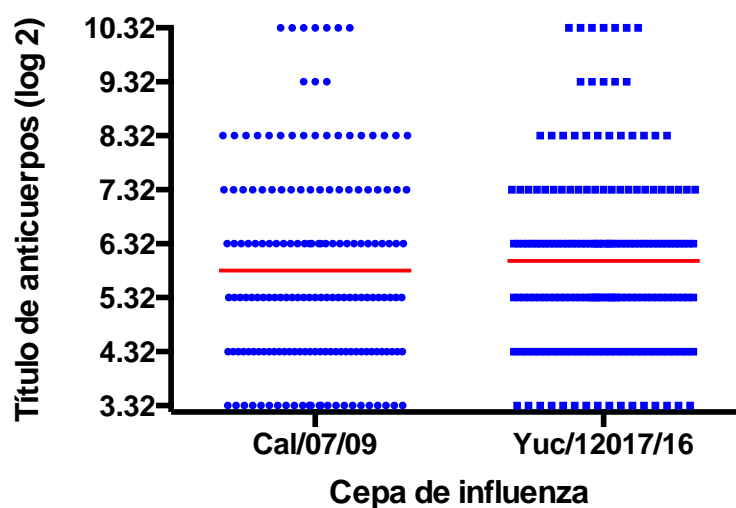


Figura 12. Representación gráfica del análisis de la prueba t del número de muestras de año 2016 con títulos de anticuerpos en los ensayos de IHA contra las cepas Cal/07/09 y Yuc/12017/16. Los símbolos de color azul corresponden a cada una de las muestras que poseen títulos de anticuerpos contra las diferentes cepas de influenza A(H1N1)pdm09; la franja de color rojo representa la media. La media y desviación estándar para la cepa Cal/07/09 son 5.82 y 1.87 mientras que para Yuc/12017/16 es 6.00 y 1.71 respectivamente.

Los resultados de este primer objetivo nos permiten concluir que en más del 50 % de las muestras de suero humano analizadas durante el período 2013-2016 se detectaron títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 y que de acuerdo a los criterios de la OMS, estos anticuerpos son considerados protectores ($\geq 1:40$) lo que significa que durante todo este período la población ya sea por infección natural o por vacunación ha estado expuesta al virus.

Para definir la relación entre los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 y la frecuencia de influenza estacional en Yucatán, se analizaron los reportes epidemiológicos de influenza de la Dirección General de Epidemiología para el período 2013-2016. Una vez obtenido el número de muestras de suero con títulos de anticuerpos protectores ($\geq 1:40$) se realizó un análisis de la distribución de ambas variables (número de casos confirmados y títulos de anticuerpos protectores).

En general, en el análisis de los casos de influenza se observó que durante el período 2013-2016 el virus pandémico en Yucatán presentó un comportamiento bianual, con un brote en el año 2013 y los primeros meses del 2014 seguido de ausencia de casos en el año 2015, hasta la ocurrencia nuevamente de casos en el año 2016 (Figura 13). Cabe resaltar que en el año 2013 y 2016 los casos de influenza se presentaron durante todo el año con un pico de circulación en los meses de junio-agosto; adicionalmente para el año 2016 se observa un primer pico mayor de circulación en los meses de febrero-abril.

El siguiente paso fue graficar el número de casos y los títulos de anticuerpos protectores por mes. Para el año 2013 se observó que durante el brote en los meses de junio a octubre hubo un incremento en el número de muestras que tuvieron títulos de anticuerpos protectores el cual fue disminuyendo en relación con el número de casos. Desafortunadamente, debido a la falta de muestras de suero de los meses enero-mayo, no fue posible determinar la asociación entre ambas variables antes del pico mayor de circulación (Figura 13).

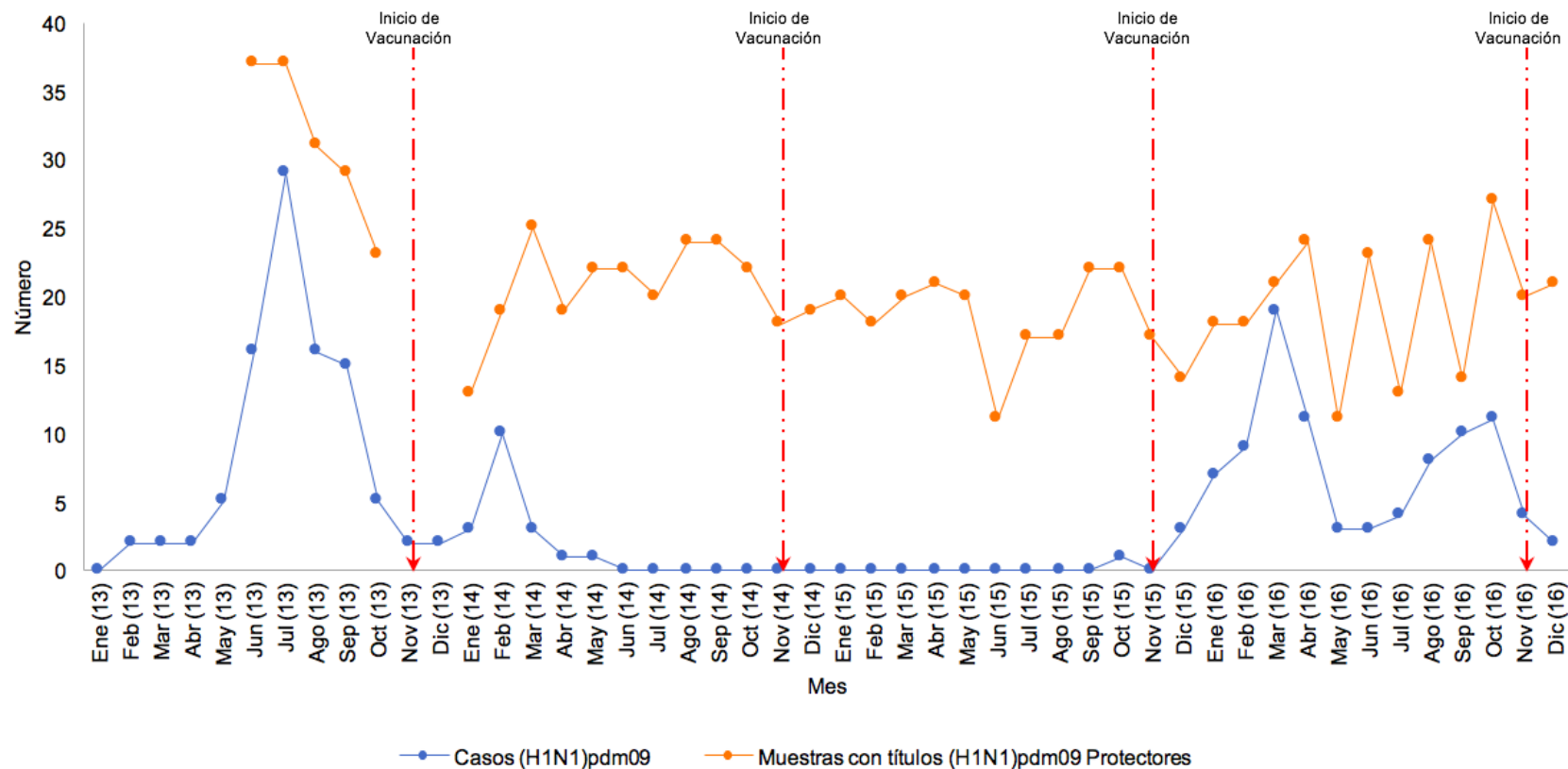


Figura 13. Casos confirmados de influenza A(H1N1)pdm09 en el estado de Yucatán y su relación con el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores $\geq 1:40$ durante el período 2013-2016. El eje x representa los casos confirmados por laboratorio por mes; el eje y representa el número total de casos y/o número de muestras con títulos protectores por mes. Las líneas punteadas de color rojo indica el inicio de la temporada de vacunación en el estado.

El siguiente periodo para analizar corresponde al año 2014, en el cual, a diferencia del año anterior, solo se registró actividad de casos de influenza en el mes de febrero acompañado por un incremento en el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores, alcanzando mayor amplitud un mes después que se registrara el pequeño brote. Considerando la alta transmisión del virus durante el año 2013 y la aplicación de la vacuna en el mes de noviembre de ese mismo año podrían considerarse ambos como factores que influyeron en la disminución de los casos de influenza durante el año 2014. Es interesante observar que el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores se mantuvo de abril a diciembre quizás jugando un papel importante al reducir la probabilidad de riesgo a infectarse (Figura 13).

De manera interesante, en el año 2015 se reportó nula actividad del virus A(H1N1)pdm09 por un período de 16 meses (junio 2014 – septiembre 2015), antes de que se reportara un solo caso en el mes de octubre y tres en el mes de diciembre. A pesar de la baja circulación y transmisión del virus, el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores se mantuvo durante todo el año, aunque por debajo del porcentaje detectado para el año 2014 (60.9 % vs 68.5 %, respectivamente) (Figura 13).

Finalmente, el año 2016 se caracterizó por mostrar un patrón muy particular tanto en el número de casos confirmados como en el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores. El mayor pico de circulación se registró de febrero a marzo y se puede observar un incremento en el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores en el mes de abril, un mes después del mayor registro de casos tal y como se observó en el año 2014; posteriormente se presentó un segundo pico de influenza durante los meses de agosto – octubre. De forma interesante, antes y durante este segundo pico de casos se puede observar un comportamiento irregular de ascenso y descenso en las muestras con títulos de anticuerpos protectores (Figura 13). Este

comportamiento irregular en los títulos de anticuerpos, podría deberse a la introducción en la población de un nuevo subgrupo de virus de influenza (6B.1) como fue reportado en diferentes partes del mundo.

Para determinar si la relación que se observó entre el número de casos y los títulos de anticuerpos era significativa se realizó un análisis de correlación, los resultados de este análisis mostraron un valor de $r = 0.6069$, lo que significa una relación positiva de tal manera que al aumentar el número de casos de influenza aumenta el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores (Figura 14).

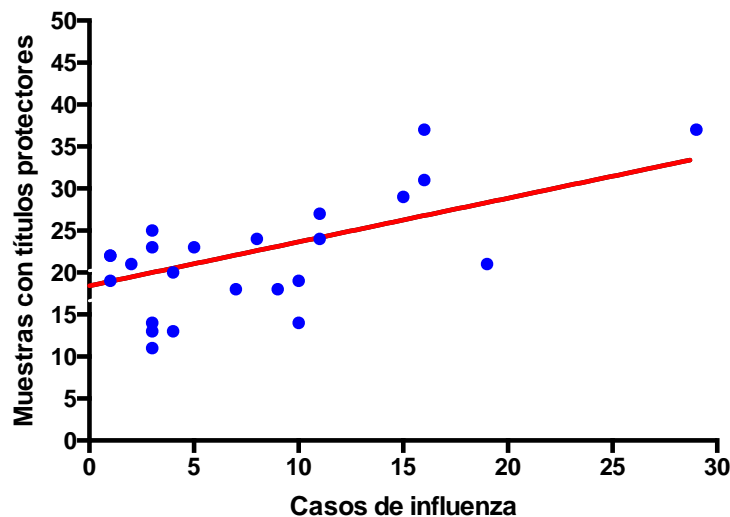


Figura 14. Gráfica de correlación entre el número de casos de influenza A(H1N1)pdm09 contra el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores. La línea en color rojo corresponde al mejor modelo de regresión ajustado con una R^2 de 0.3684 ($p < 0.0001$).

Una observación importante fue que, sin importar el año, la aplicación de la vacuna en el mes de noviembre no mostró tener un efecto en el incremento de los títulos de anticuerpos en la población estudiada. Considerando que las muestras de suero analizadas provienen de una población de adultos jóvenes entre 18 y hasta 65 años de edad donadores de sangre, la cual es una población que no se considera dentro del esquema nacional de vacunación ni entre los grupos de riesgo, esto podría ser la razón de este fenómeno.

Otro aspecto relevante en este estudio es el papel que desempeña en la transmisión del virus aquella población estudiada que no presentó títulos de anticuerpos protectores. Como se observa en la Figura 15, en el año 2013 para el período analizado (junio – octubre) existe una proporción de casi 50:50 entre el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores y no protectores. Esta relación disminuye con un decremento hasta del 31 % de muestras con títulos no protectores en el año 2014, resultado probablemente como se mencionó anteriormente de la alta circulación y transmisión del virus durante el año previo. Posteriormente, para el año 2015 donde no se registró actividad del virus en casi todo el año, el porcentaje de muestras con títulos no protectores incrementa nuevamente hasta casi un 40 %, el cual disminuye ligeramente a un 34.5 % en el año 2016 a pesar de tener una alta actividad de transmisión del virus durante este último año de estudio.

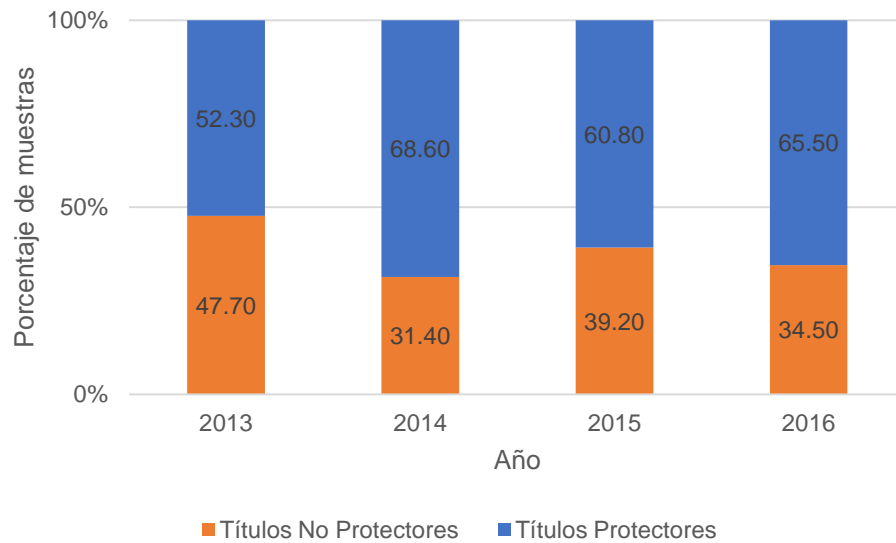


Figura 15. *Proporción de muestras con títulos de anticuerpos protectores ($\geq 1:40$) y no protectores ($< 1:40$) contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 durante el período 2013-2016.*

En general, los resultados de este objetivo nos permiten concluir que los títulos de anticuerpos desempeñan un papel importante en la frecuencia de casos de influenza A(H1N1) con una correlación directa con el aumento en la frecuencia de muestras con títulos de anticuerpos protectores los cuales se mantienen siempre y cuando los virus circulantes no sufran variaciones genéticas importantes en el gen de HA que modifique la antigenicidad y la respuesta de anticuerpos. Así mismo, los resultados de este estudio demuestran que, para Yucatán, la aplicación de la vacuna posterior al período de actividad del virus parece tener poco efecto en la inmunidad de la población estudiada debido que los brotes de mayor intensidad no ocurren durante el período invernal.

Para identificar la relación antigénica entre los virus aislados en el año 2013 y 2016 con respecto a la cepa vacunal Cal/07/09, el primer paso fue determinar las características genéticas de los virus de influenza. Para el año 2013, se seleccionaron 3 aislados virales que previamente fueron caracterizados genéticamente y se identificaron mutaciones en los sitios antigénicos de la proteína HA como se indica en el Cuadro 5 (comunicación personal Dra. Guadalupe Ayora).

Cuadro 5. Mutaciones en la proteína HA del virus de Influenza A(H1N1)pdm09 en muestras recolectadas en el año 2013.

Muestra	Mutación HA
Yuc/138/13	A141T (Sitio antigénico Ca)
Yuc/152/13	S162I (Sitio antigénico Sa)
*Yuc/250/13	-----

*Se seleccionó para ver si el hecho de no tener mutación en HA lo hace antigénicamente diferente.

Para determinar si las mutaciones detectadas en los sitios antigénicos de los virus del 2013 dan lugar a variantes antigénicas, se procedió a realizar el ensayo de IHA utilizando un anti-suero de referencia de la cepa Cal/07/09. Los resultados del ensayo indicaron que los tres virus del 2013 reaccionaron con el antisuero de referencia con títulos de IHA de 1:1280 igual que la cepa de referencia, sugiriendo que las mutaciones en HA no los hacen antigénicamente diferentes. Estos resultados se pueden visualizar en la Figura 16, en donde utilizando la cartografía antigénica, se puede observar que los tres puntos correspondientes a cada uno de los virus analizados se encuentran ubicados en el mismo espacio que la cepa de referencia.

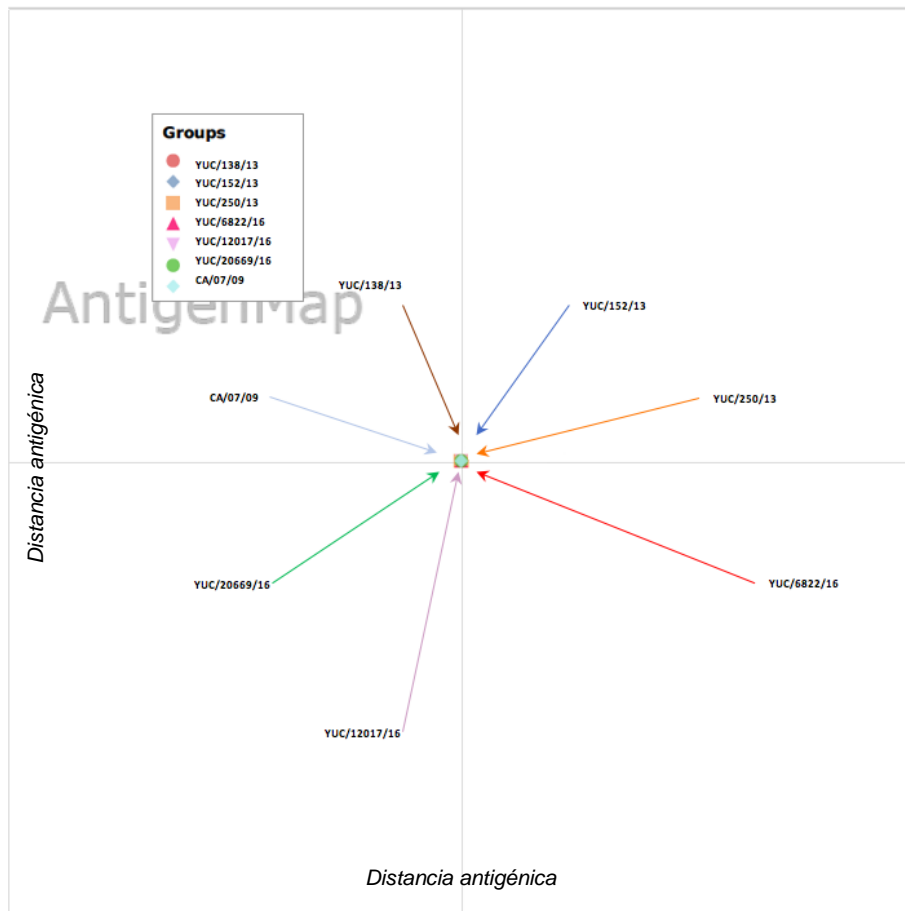


Figura 16. Cartograma Antigénico en 2D de los virus de Influenza A(H1N1)pdm09 del 2013 y 2016 utilizando como referencia al virus Cal/07/09. Cada virus está identificado con un color y la distancia antigénica entre ellos y la cepa de referencia (ejes x, y) está representada por el correspondiente título de IHA; cada cuadrícula es una unidad antigénica de distancia que equivale a una dilución doble seriada (1:10 hasta 1:1280).

Con respecto a las muestras del 2016, de un total de 63 muestras con resultado positivo a influenza A(H1N1)pdm09, se seleccionaron 24 muestras clínicas para realizar el aislamiento viral, de las cuales sólo en 13 hubo presencia de virus con títulos de hemaglutinación positivos. De las 13 muestras aisladas, se seleccionaron 3 identificadas como Yuc/6822/16, Yuc/12017/16 y Yuc/20669/16 cuyos títulos de HA fueron de 1:64, 1:128 y 1:64

respectivamente. Para realizar la caracterización genética del gen HA, se amplificaron tres fragmentos de PCR correspondientes al gen completo de HA para cada una de los aislados seleccionados (Figura 17), que empalmados permitieron obtener la secuencia completa de 1778 pb. Los fragmentos de PCR se purificaron y fueron enviados al Instituto de Genómica de la Universidad de Clemson para obtener la secuencia de nucleótidos de cada segmento por el método de Sanger.

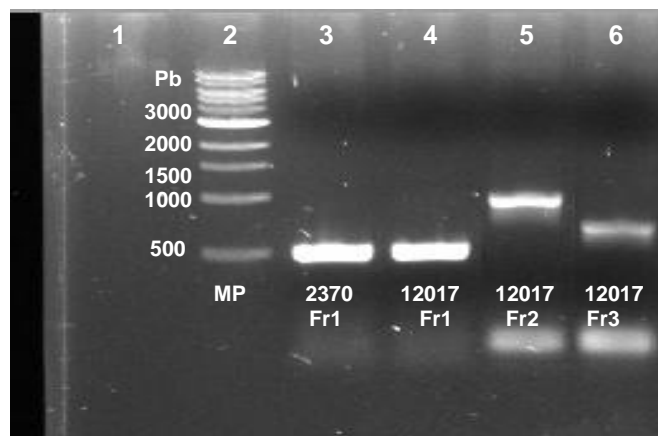


Figura 17. Gel de agarosa al 1 % que muestra la amplificación de los fragmentos del gen HA del aislado viral Yuc/12017/16. En el carril 2 se observa el marcador de peso molecular de 1 kb, en el carril 3 y 4 se observa el fragmento 1 de 440 pb, carril 5 fragmento 2 de 861 pb y carril 6 fragmento 3 de 654 pb. El carril 3 corresponde al control positivo (cepa Yuc/2370/09).

Una vez que se tuvieron las secuencias de aminoácidos de la HA de los virus aislados del 2016, se realizó un alineamiento utilizando la cepa Cal/07/09 como referencia para buscar mutaciones en los sitios antigénicos y/o en regiones cercanas al sitio de unión al receptor (Figura 18).

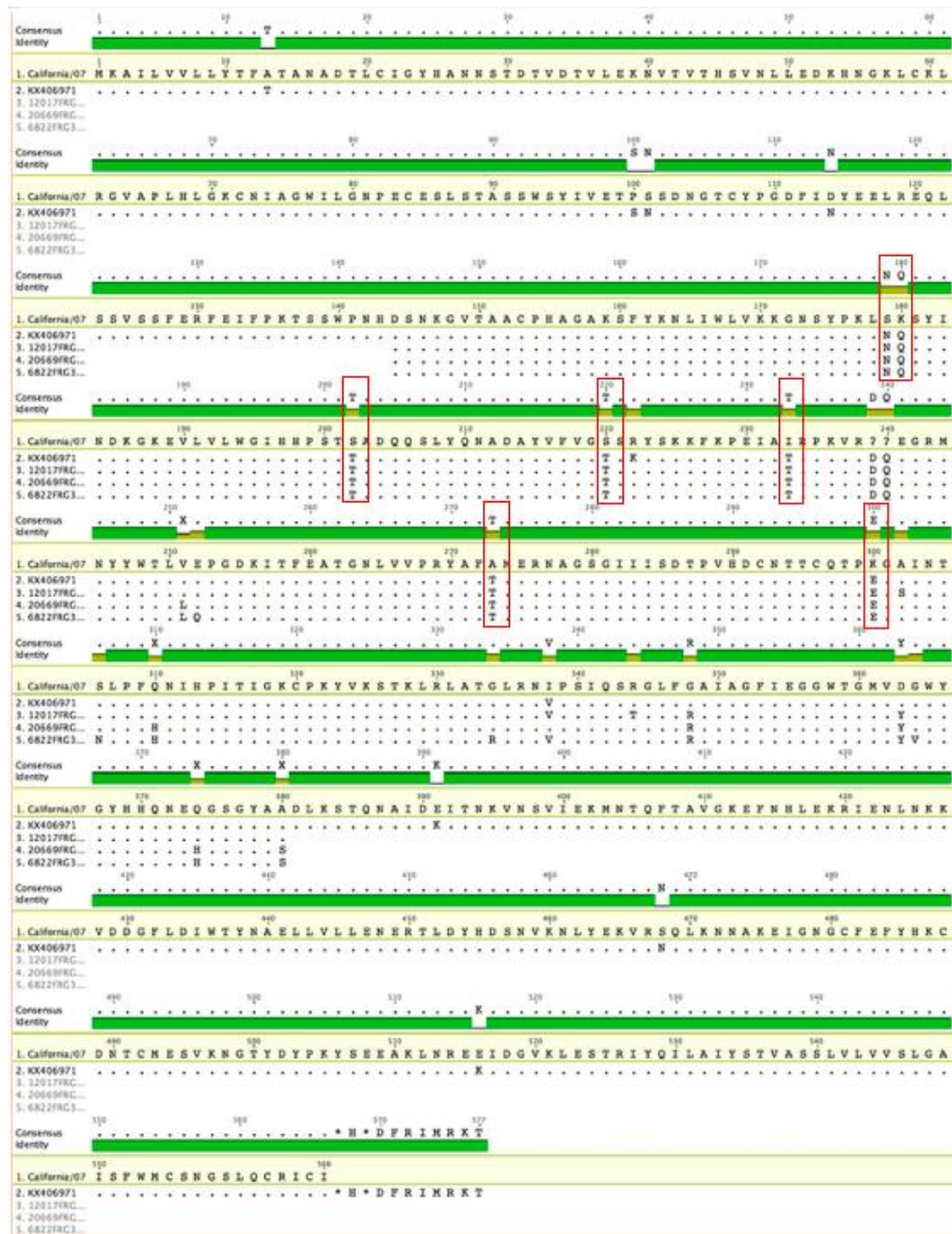


Figura 18. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA de los virus aislados del 2016 utilizando la cepa Cal/07/09 como referencia. Las mutaciones identificadas en los sitios antigénicos y/o en regiones cercanas al sitio de unión al receptor se encuentran señalados en recuadros de color rojo; la muestra KX406971 es una secuencia de HA con mayor porcentaje de identidad con los aislados del 2016.

A través del análisis de las secuencias del gen HA se identificaron 7 mutaciones, todas presentes en las 3 muestras aisladas del año 2016 que se localizaron en algún sitio antigénico y en regiones cercanas al sitio de unión al receptor de la HA viral (Cuadro 6).

Cuadro 6. Mutaciones en la proteína HA del virus de Influenza A(H1N1)pdm09 encontradas en las muestras recolectadas en el año 2016.

Muestra	Mutación HA
Yuc/6822/16 Yuc/12017/16 Yuc/20669/16	S162N (Sitio antigénico Sa)
	K163I (Sitio antigénico Sa)
	S185T (Sitio antigénico Sb)
	S203T (Sitio antigénico Ca)
	I216T
	A256T
	K283E

Una vez realizada la caracterización genética, se procedió a realizar la caracterización antigénica de estos virus utilizando el antisuero de referencia. A través del ensayo de IHA se determinó que los virus aislados del 2016 a pesar de contener mutaciones en los sitios antigénicos de la HA, reaccionaron con títulos de IHA de 1:1280 con el antisuero de referencia, igual que la cepa vacunal Cal/07/09. Esto sugiere que las mutaciones en HA de los virus aislados del año 2016 no los hacen antigénicamente diferentes respecto de la cepa de referencia. Los resultados se pueden visualizar en la Figura 13.

De acuerdo al análisis con la identificación de mutaciones en la secuencia del gen completo de HA y lo que está reportado por los Centros de Colaboración de la OMS para influenza, los virus del año 2016 identificados en este trabajo pertenecen al subclado genético 6B.1 los cuales se encuentran circulando mundialmente con excepción en Asia y Oceanía, mientras que los

virus del año 2013 pertenecen al clado 6C (comunicación personal Dra. Guadalupe Ayora) los cuales circularon en Costa Rica, Japón, Estados Unidos y México.

Los resultados de este objetivo permiten concluir que a pesar de que los virus aislados en el año 2013 y 2016 poseen mutaciones en el gen HA en sitios antigénicos y/o en regiones cercanas al sitio de unión al receptor, con base a los títulos de IHA y la cartografía antigénica, no existen diferencias y por lo tanto son similares a la cepa vacunal Cal/07/09.

Para evaluar la relación antigénica entre los anticuerpos detectados en sueros de humano y virus de influenza A(H1N1)pdm09, a partir de los títulos de anticuerpos obtenidos a través de los ensayos de IHA se elaboraron los cartogramas antigénicos del período 2013-2016 con ayuda del software en línea Antigenic Cartography de ACMACS. Cabe mencionar que para poder elaborar los cartogramas antigénicos en 2 dimensiones fue necesario analizar las muestras de suero con más de un virus.

Adicionalmente, y de acuerdo a los parámetros de la OMS, para establecer que los anticuerpos contenidos en una muestra de suero corresponden antigénicamente contra la cepa con la que se está evaluando es necesario que existan ≤ 5 unidades antigénicas entre ambos. Es así que el cartograma antigénico generado para las muestras de suero del año 2013 mostró que éstas se distribuyeron principalmente hacia ambos lados (izquierdo y derecho) con respecto al virus de referencia Cal/07/09 con algunas muestras en la parte superior e inferior del cartograma (Figura 19). Es interesante recalcar que a pesar de que no existe diferencia antigénica entre la cepa de referencia y los otros virus analizados (Yuc/138/13, Yuc/152/13, y Yuc/250/13), en presencia de las muestras de suero estos virus se alejaron hasta por 3 unidades antigénicas del virus de referencia.

Considerando la distancia antigénica como el parámetro que define la distribución de las muestras en el cartograma, se determinó para el año 2013 que el 57 % de las muestras analizadas poseen títulos de anticuerpos protectores que reconocen a la cepa vacunal, mientras el 43 % posee anticuerpos que no reconocen al virus Cal/07/09, y por lo tanto esta población se encuentra posiblemente en mayor riesgo de infectarse con virus de influenza A(H1N1)pdm09 circulantes (Figura 19). Las distancias antigénicas reportadas durante el análisis se encontraron en el rango de 1.12 para la más cercana hasta 9.55 para la más lejana.

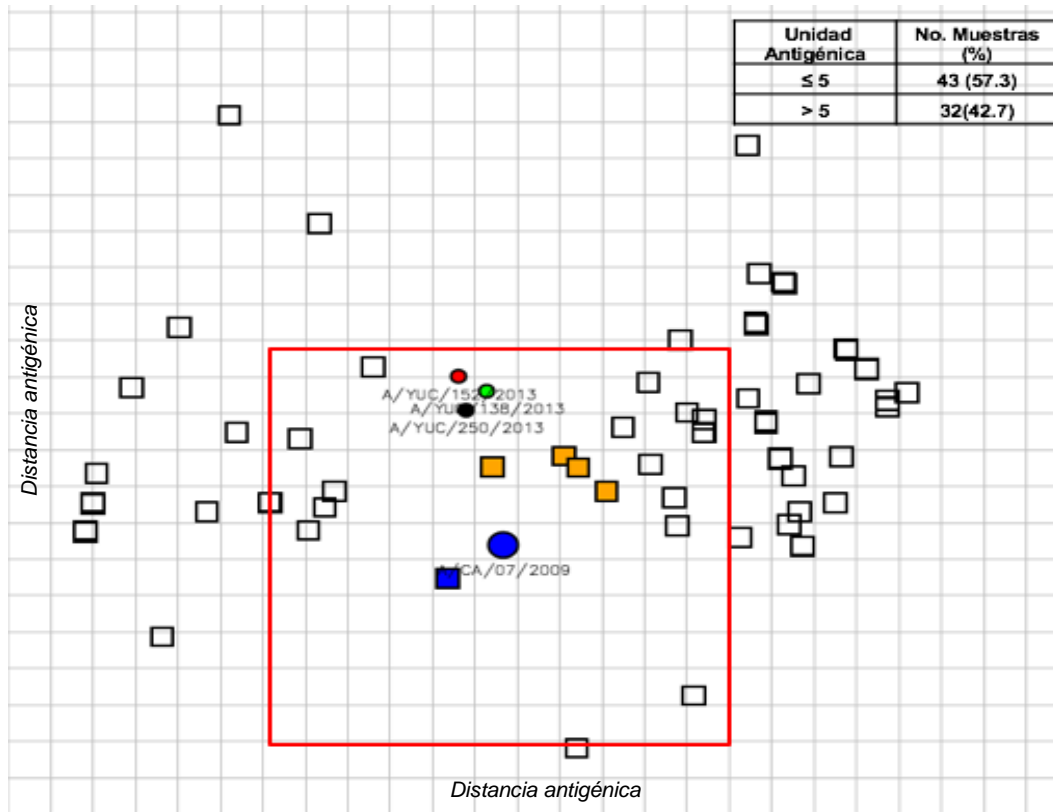


Figura 19. Cartograma Antigénico basado en los títulos de IHA de los sueros del año 2013 utilizando como referencia el virus Cal/07/09. Cada cuadro de borde negro representa a una muestra de suero (cuadros con borde mas oscuro indican que más de una muestra se localiza en el mismo espacio), los cuadros de color naranja representan muestras con títulos elevados (1:320) de anticuerpos contra las cepas de influenza del 2013 y para la cepa de referencia mientras que el cuadro azul representa una muestra con título elevado (1:640) solamente contra la cepa de referencia; cada virus está representado con un círculo coloreado. El borde cuadrado de color rojo incluye a aquellas muestras que se encuentran a una distancia antigénica ≤ 5 unidades con respecto a la cepa de referencia.

El siguiente cartograma antigénico se elaboró para las muestras de suero del año 2014 respecto a la cepa de referencia Cal/07/09 y el virus

Yuc/12017/16. La distribución de las muestras en el cartograma basada en la distancia antigénica mostró un patrón diferente del observado para el año 2013, con una distribución radial tipo “rehilete”. De igual manera y como se observó en la Figura 16, a pesar de no existir diferencias antigénicas entre ambos virus Cal/07/09 y Yuc/12017/16, cuando se encuentran presentes las muestras de suero se observa una distancia antigénica de 3 unidades entre ambos (Figura 20).

Considerando las distancias antigénicas obtenidas para cada muestra de suero se obtuvo que, el 55.5 % de las muestras se encuentran antigénicamente relacionadas con el virus de referencia mientras que el 44.5 % no, sugiriendo que cerca de la mitad de los pacientes que se analizaron se encuentran en riesgo a infectarse con el virus de influenza A(H1N1)pdm09 circulante (Figura 20). El rango de valores de las distancias antigénicas se encontró desde 0.71 para la más cercana hasta un valor de 8.95 para la más lejana.

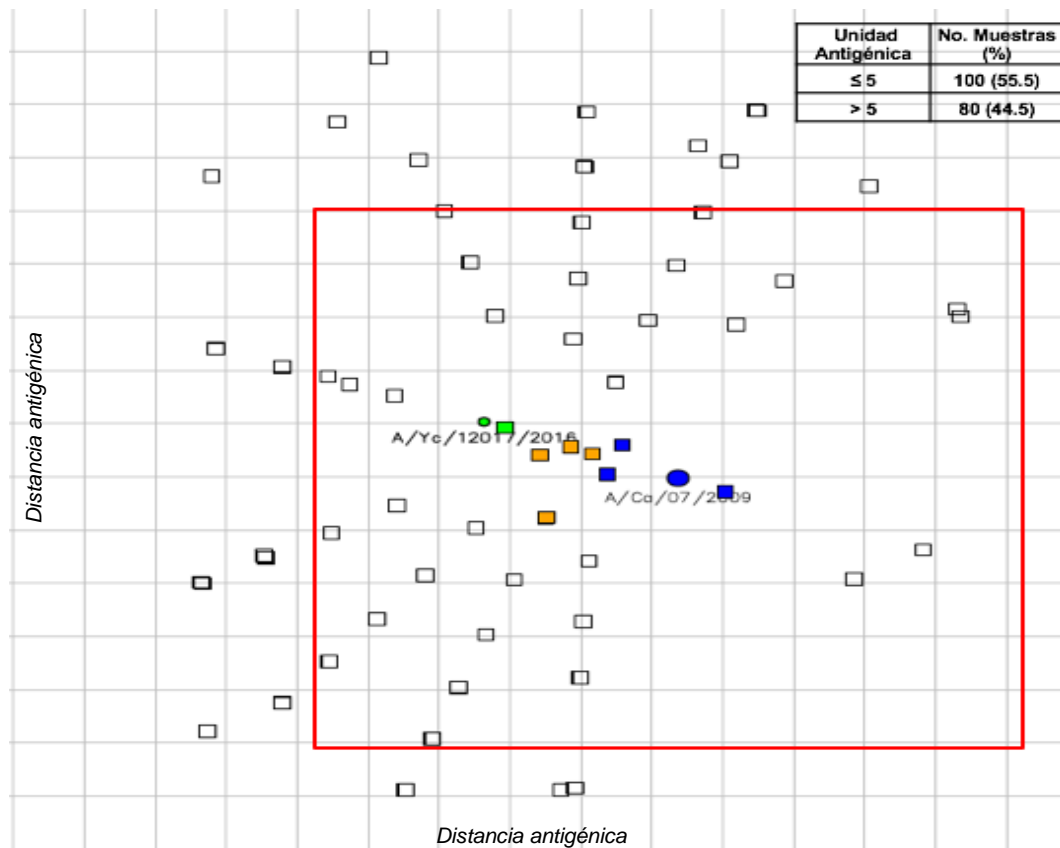


Figura 20. Cartograma Antigénico basado en los títulos de IHA de los sueros del año 2014 utilizando como referencia el virus Cal/07/09. Cada cuadro de borde negro representa a una muestra de suero (cuadros con borde más oscuro indican que más de una muestra se localiza en el mismo espacio), el cuadro de color verde representa una muestra con título elevado (1:1280) contra la cepa del 2016, los cuadros de color naranja representan muestras con títulos elevados de anticuerpos (1:640) contra la cepa de influenza del 2016 y para la cepa de referencia mientras que los cuadros de color azul representan muestras con títulos elevados (1:1280) solamente contra la cepa de referencia; cada virus está representado con un círculo coloreado. El borde cuadrado de color rojo incluye a aquellas muestras que se encuentran a una distancia antigénica ≤ 5 unidades con respecto a la cepa de referencia.

Respecto al cartograma antigénico para las muestras del año 2015, el análisis mostró una distribución de las muestras muy similar a la distribución del año 2014, con esa distribución radial en forma de rehilete. Además, la distancia antigénica que entre la cepa de referencia y el virus aislado del 2016 fue de 2.084 unidades, mucho menor que la registrada en el año 2014 y sin exceder las 4 unidades antigénicas por lo que existe relación antigénica entre ellas (Figura 21).

Con las distancias antigénicas que existen entre las muestras y la cepa de referencia se pudo determinar que el 57.7 % de las muestras poseen títulos de anticuerpos protectores contra la cepa vacunal mientras que el 42.3 % no se encuentra protegida, lo que nos indica que desde el año 2013 este porcentaje de riesgo en la población ha sido mayor al 42 %, un porcentaje relativamente alto. El rango de valores de las distancias antigénica se encontró desde 0.61 para la más cercana hasta un valor de 8.94 para la más lejana (Figura 21).

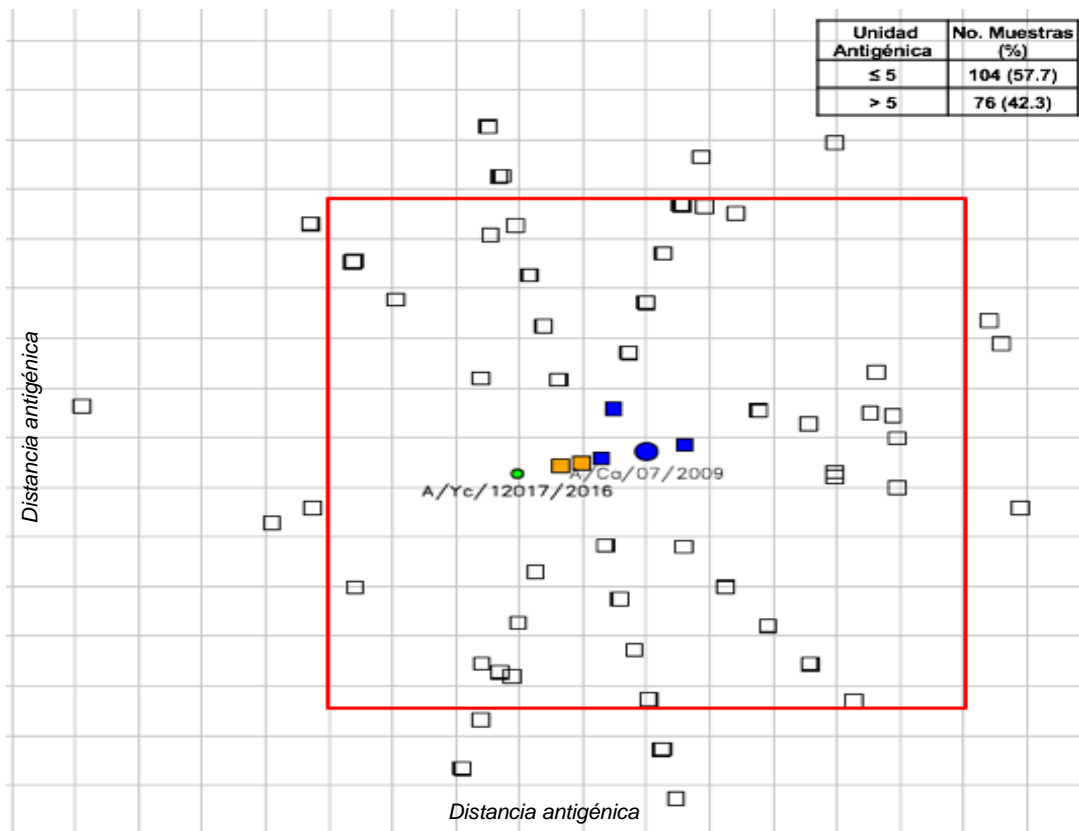


Figura 21. Cartograma Antigénico basado en los títulos de IHA de los sueros del año 2015 utilizando como referencia el virus Cal/07/09. Cada cuadro de borde negro representa a una muestra de suero (cuadros con borde mas oscuro indican que más de una muestra se localiza en el mismo espacio), los cuadros de color naranja representan muestras con títulos elevados de anticuerpos (1:640) contra la cepa de influenza del 2016 y para la cepa de referencia mientras que los cuadros de color azul representan muestras con títulos elevados (1:1280) solamente contra la cepa de referencia; cada virus está representado con un círculo coloreado. El borde cuadrado de color rojo incluye a aquellas muestras que se encuentran a una distancia antigénica ≤ 5 unidades con respecto a la cepa de referencia.

Finalmente, el análisis del cartograma antigénico del año 2016 mostró una distribución radial en forma de rehilete, muy similar a lo ocurrido en los cartogramas de los años 2014 y 2015 con muy pocas muestras situadas cercanas a los virus, es decir, aquellas que poseen títulos de anticuerpos elevados contra los virus de influenza. La distancia antigénica entre la cepa vacunal y el virus aislado del 2016 fue de 1.94 unidades, la más pequeña registrada durante el período 2013-2016 pero de manera interesante al analizar las distancias antigénicas entre la cepa Cal/07/09 y las muestras, se encontró que solamente el 51 % son menores o iguales a 5 unidades antigénicas es decir poseen títulos de anticuerpos protectores contra la cepa vacunal mientras que el 49 % de las muestras poseen más de 5 unidades de distancia que se traduce en tener mayor riesgo a infectarse. El rango de valores de las distancias antigénicas entre las muestras y la cepa de referencia se encontró desde 0.62 para la más cercana hasta un valor de 9.19 para la más lejana (Figura 22). Además, se observó que con el paso de los años se observa que el porcentaje de muestras reaccionan cada vez menor contra el virus de referencia Cal/07/09 porque las distancias antigénicas entre virus-muestra se van haciendo cada vez mayores (Figura 23).

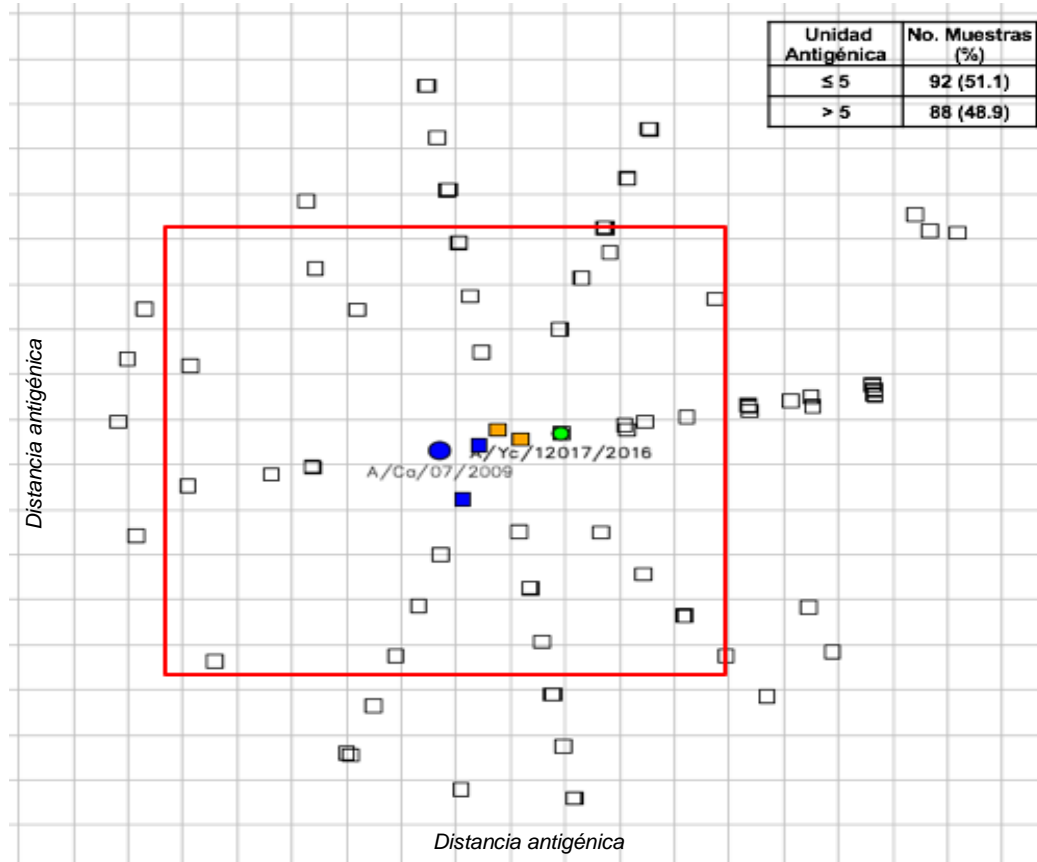


Figura 22. Cartograma Antigénico basado en los títulos de IHA de los sueros del año 2016 utilizando como referencia el virus Cal/07/09. Cada cuadro de borde negro representa a una muestra de suero (cuadros con borde más oscuro indican que más de una muestra se localiza en el mismo espacio), los cuadros de color naranja representan muestras con títulos elevados de anticuerpos (1:640) contra la cepa de influenza del 2016 y para la cepa de referencia mientras que los cuadros de color azul representan muestras con títulos elevados (1:1280) solamente contra la cepa de referencia; cada virus está representado con un círculo coloreado. El borde cuadrado de color rojo incluye a aquellas muestras que se encuentran a una distancia antigénica ≤ 5 unidades con respecto a la cepa de referencia.

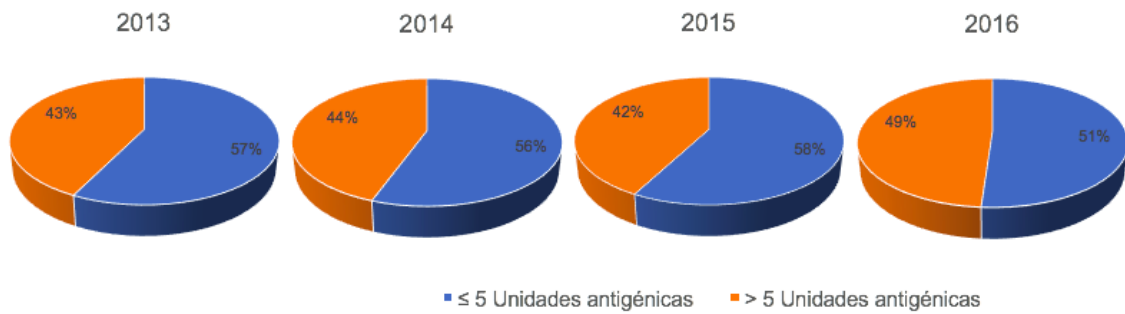


Figura 23. *Porcentaje de muestras de suero con distancia antigénica ≤ 5 unidades (azul) o > 5 unidades (naranja) del período 2013-2016 con respecto a la cepa vacunal Cal/07/09.*

Con los cartogramas antigénicos construidos a partir de los sueros de humanos colectados del período 2013-2016, podemos concluir que los virus de influenza de los años 2013 y 2016 están relacionados antigénicamente con la cepa de referencia Cal/07/09 debido que poseen una distancia ≤ 4 unidades antigénicas lo cual respaldan los resultados del objetivo 3 al establecer que las mutaciones identificadas en la HA de los virus aislados no los hacen antigénicamente diferentes con respecto a la cepa vacunal. Sin embargo, a través del análisis de los cartogramas antigénicos también se encontró que desde el período 2013-2016 la proporción de muestras analizadas que poseen títulos de anticuerpos protectores contra la cepa vacunal ha disminuido hasta casi la mitad y por tanto se encuentran en riesgo a infectarse.

VIII. DISCUSIÓN

Después de revisar la literatura y ante las escasas investigaciones de estudios serológicos que existen en nuestro país, éste es el primer trabajo en México y en Yucatán en evaluar el estado inmune de la población sin discernir si los anticuerpos detectados en las muestras de suero son por infección natural o por vacunación a influenza durante un gran período de tiempo del 2013-2016, además de utilizar una herramienta novedosa para el análisis de resultados como lo es el cartograma antigénico.

En este proyecto de investigación se analizó por primera vez en un tamaño de muestra principalmente de residentes de la ciudad de Mérida cual es el estado inmune de la población con respecto al virus de influenza A(H1N1)pdm09. Para responder esta pregunta se analizaron 615 muestras de suero de humanos colectadas del período 2013-2016 para determinar los títulos de anticuerpos contra el virus a través de los ensayos de IHA. Las muestras fueron obtenidas del banco de sueros del Laboratorio Estatal de Salud Pública que llegaron como parte del control de calidad de pacientes donadores de sangre y confirmadas con resultado negativo a VIH con edades entre 18-65 años, que de acuerdo a la valoración médica al momento de donar tuvieron buena salud en general, es decir, acudieron sin tos, gripe, dolores de cabeza o estómago, sin padecer hepatitis, sífilis o paludismo, cáncer, VIH/SIDA o enfermedades severas del corazón.

Adicionalmente, debido a la variabilidad genética que ha ocurrido en el virus desde su aparición en el año 2009 se propuso determinar si las mutaciones detectadas en el gen de la HA del virus, modifican la respuesta de anticuerpos de las personas hacia la cepa Cal/07/09 utilizada en la vacuna. Los resultados de los ensayos de IHA permitieron confirmar que más de la mitad de las personas se encuentran protegidas contra el virus pandémico.

Diversos estudios serológicos se han realizado a nivel mundial para determinar el estado inmune de la población. Por ejemplo, recientemente un estudio realizado en Israel durante la temporada 2015-2016 determinó un incremento en la prevalencia de infecciones por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 y además encontró mayores títulos de anticuerpos contra la cepa de la vacuna Cal/07/09 en comparación con las cepas circulantes a través de ensayos de IHA, por lo que la vacunación no fue lo suficientemente eficaz y propusieron que se incluya un virus de influenza actual en la composición de la vacuna.⁵⁹ Otro estudio realizado durante la temporada de influenza 2013-2014 concluyó que la protección se asocia con títulos de IHA contra una cepa (H1N1)pdm09 mutada pero no con títulos contra la cepa vacunal, es decir, los que tuvieron títulos de anticuerpos protectores contra la cepa mutada se infectaron menos y también sugirieron que cepas de influenza actuales deberían ser consideradas para futuras vacunas.⁶⁰ Otros estudios se han enfocado a determinar el nivel de anticuerpos contra el virus de influenza como el que se realizó en Polonia durante la temporada 2013-2014 en sueros de personas de diferentes grupos de edad el cual, a través de ensayos de IHA se encontró que los niveles de anticuerpos contra los virus de influenza fueron muy bajos y la tasa de protección en algunos grupos de edad no alcanzó el 60 %, lo cual indicó que las complicaciones pueden ser peligrosas para la salud y ponen en riesgo a las personas que no están vacunadas especialmente en los más jóvenes, los ancianos y aquellos con graves condiciones médicas.⁶¹

En México, son pocos estudios donde se ha investigado cual es el estado inmune de la población. Tenemos el trabajo de Aguilar G. y colaboradores (2015) los cuales determinaron que la tasa de seropositividad de anticuerpos en personal de salud del Instituto Mexicano del Seguro Social contra el virus pandémico del período comprendido entre 2009-2010 fue muy baja tanto para vacunados como no vacunados siendo los médicos el grupo con más riesgo debido a la exposición ocupacional con pacientes sospechosos a influenza;

además la baja seroprevalencia en el grupo de vacunados indicó que entre el 67-73 % estaba susceptible a infectarse producto de la pobre inmunogenicidad de la vacuna.⁶² Otro estudio realizado por Valero N. y colaboradores (2016) determinaron la persistencia de respuestas de anticuerpos en adultos que fueron inducidas con una vacuna de influenza de partículas tipo virus (VLP, Virus-Like Particles) hasta por 25 meses después de la aplicación durante la segunda ola de la pandemia del 2009 en la ciudad de México, además se encontró que los sujetos que recibieron una revacunación compuesta de virus de influenza inactivada mostraron mayores títulos de anticuerpos seroprotectores que aquellos que no se vacunaron de nuevo.⁶³

A pesar de que las muestras evaluadas durante el periodo 2013-2016 tuvieron títulos de anticuerpos contra los virus de influenza A(H1N1)pdm09, se encontraron pequeñas diferencias con respecto al número de muestras con títulos < 1:10 hasta 1:1280 donde en algunas ocasiones se registraron más muestras que presentaron títulos de anticuerpos contra la cepa de referencia Cal/07/09 y otras, como ocurrió con mayor frecuencia donde hubieron más muestras que tuvieron títulos contra los virus evaluados Yuc/138/13, Yuc/152/13, Yuc/250/13 y Yuc/12017/16. Esta característica también se describió recientemente por Petrie J. y colaboradores (2016) los cuales encontraron que el número de muestras con títulos de IHA contra la cepa vacunal y contra un virus Cal/07/09 diseñado para poseer la mutación K166Q en HA durante la temporada de influenza 2013-2014 fueron similares.⁶⁰

De acuerdo a la OMS los títulos de IHA \geq 1:40 han sido asociados históricamente con cerca del 50 % de protección contra el virus de la influenza después de una exposición; y aunque en los años 2013 y 2015 hubo mayor cantidad de muestras que tuvieron títulos de anticuerpos protectores \geq 1:40 contra la cepa de referencia Cal/07/09, en el 2014 y 2016 se pudo observar que este comportamiento fue diferente donde las muestras analizadas tuvieron más

títulos de anticuerpos protectores contra la cepa Yuc/12017/16. Esto muestra que a pesar de que la gente se vacuna utilizando la cepa de referencia, las respuestas de anticuerpos se podrían mejorar incluyendo una cepa A(H1N1)pdm09 actual en futuras formulaciones debido que los virus de influenza han evolucionado y el componente H1N1 no ha sido actualizado en varios años.

Una de las características observadas en los ensayos de IHA fue la manera particular en que el número de muestras del conjunto de diluciones posibles (<1:10 hasta 1:1280) se distribuyeron normalmente, característica que se observó con todos los resultados obtenidos durante el período 2013-2016 y cuyo comportamiento estuvo bien definido. Esta característica se ha documentado en muestras de adultos de Singapur en los cuales se calculó la tasa de reducción de títulos de anticuerpos a influenza A(H1N1)pdm09 después de la seroconversión, sin embargo la distribución normal se apreció mejor en ensayos de MN que en IHA.⁶⁴ Otro registro, se realizó al analizar la distribución natural de los títulos de anticuerpos de la población, en general del sur de Vietnam contra un virus subtipo H1N1 (A/California/06/2009) y dos subtipos H3N2 (A/Victoria/210/2009 y A/Victoria/361/2011) durante la temporada 2009-2013, en los cuales se encontró una distribución normal de tipo bimodal para el subtipo H1N1 y distribuciones normales de tipo unimodal en los subtipos H3N2, utilizando un método para la detección de títulos de anticuerpos basado en micro arreglos de proteínas con diluciones de 1:20 hasta 1:1280.⁶⁵

El comportamiento bimodal se ha relacionado con la historia del linaje de los subtipos a los que se han expuesto los individuos, es decir si se separan las muestras dentro de grupos de exposición a linajes H1N1 (antes de 1957, después de 1977 y después del 2009), se puede explicar el patrón bimodal en H1N1; sin embargo, la separación de las muestras por año de nacimiento no proporciona evidencia alguna para este efecto,⁶⁵ así los títulos son más altos

contra las cepas cuando los individuos tienen entre 5-10 años y después disminuyen constantemente, pero los títulos comienzan a aumentar después de los 60 años.⁶⁶ Nuestros resultados contrastaron con este último estudio quizá porque las muestras de suero que analizamos no pertenecen a población en general, si no que pertenecen en su mayoría a adultos jóvenes sin contar con muestras de individuos de los extremos de la vida.

Si pensamos en la distribución normal que presentan los títulos de IHA, y que la mayoría están concentrados en 1:40 y 1:80 esto puede sugerir que esta población que estamos analizando no ha estado en contacto reciente con el virus, quizás la gran mayoría se infectó durante la pandemia y estos anticuerpos que estamos detectando son los que quedan después 4, 5 o 6 años que se infectaron, es decir solo aquellas muestras con títulos a partir de 1:160 podrían sugerir que estas personas si tuvieron contacto reciente, que en general, son la minoría. Sin embargo, hay que tener cautela porque una muestra con título alto podría representar una infección reciente, pero algunos individuos pueden mantener títulos altos durante más tiempo y esto se observa frecuentemente, pero no de manera exclusiva, en los niños. Del mismo modo, títulos más bajos de anticuerpos podrían indicar una infección histórica pasada, una respuesta baja a una infección reciente o una infección reciente pero leve. Sólo con datos serológicos por sí solos, estos escenarios no pueden ser distinguidos.⁶⁷

En Yucatán estudios previos han demostrado que el virus circula con una estacionalidad diferente a lo que se reporta a nivel nacional con predominio en la primavera y el verano, sin embargo, se quería conocer si la circulación del virus de influenza está relacionada con la prevalencia de los títulos de anticuerpos protectores de la población de estudio. Al realizar el análisis de la relación entre los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 y la frecuencia de influenza estacional en Yucatán durante el período 2013-2016 se observó que los casos de influenza estuvieron presentes

en la mayoría de los meses durante los años 2013 y 2016 con brotes muy marcados, mientras que durante el 2014 se detectó un ligero brote al inicio y para el año 2015 solo hubo un reducido número de casos al final, es decir hubo un período de 20 meses donde no se registraron casos de influenza. Sin embargo, se observó que después de cada brote hubo un incremento en el número de muestras con títulos de anticuerpos protectores e incluso durante los meses donde no se presentaron casos de influenza, se mantuvo estable el número de muestras que tuvieron títulos de anticuerpos protectores $\geq 1:40$. Este comportamiento regular de los anticuerpos podría ser explicado porque durante los años 2014 y 2015 el virus de influenza no sufrió mutaciones significativas en el gen de HA permaneciendo en el clado 6B lo cual evitó la falla en el reconocimiento de los anticuerpos de los pacientes.²⁹

En residentes de Pittsburgh, EU, durante las temporadas 2009-2010 y 2010-2011 se encontró que el porcentaje de muestras con títulos de anticuerpos protectores contra la cepa de referencia Cal/07/09 se mantuvo principalmente en adolescentes, que es el grupo con más riesgo de infectarse, aunque no se pudo distinguir entre las respuestas inducidas por vacuna de aquellas inducidas por infección natural; además, los adultos en particular mayores de 60 años tuvieron anticuerpos de reacción cruzada contra diferentes cepas de influenza A(H1N1)pdm09.⁶⁸

Diversas investigaciones han relacionado el aumento de la tasa de seroprotección contra subtipos A(H3) y A(H1)pdm09 con la circulación de virus predominantes en temporadas de influenza,⁶⁹ los cuales disminuyen después de la infección, pero persisten en las siguientes estaciones de influenza; es decir, después de un pico inicial por causa de una infección o vacunación los títulos de anticuerpos disminuyen hasta alcanzar un nivel estabilizado que se mantiene durante varios años.⁷⁰ Sólo en el año 2016 hubo un comportamiento irregular en los títulos de anticuerpos protectores de abril a noviembre lo cual

podría ser explicado debido a la evolución del virus de influenza y por tanto su clasificación en los subclados 6B.1 y 6B.2 lo cual provocó el fallo en el reconocimiento de los anticuerpos hacia el virus; de hecho se han encontrado 18 diferencias de aminoácidos entre las cepas pertenecientes a esos subclados y la cepa vacunal Cal/07/09.⁵⁹

Como se pudo observar en los resultados de la Figura 12, la estacionalidad del brote de influenza del año 2013 se registró de manera constante durante todo el año con un incremento significativo en el verano, mientras que los brotes del 2016 se registraron en primavera y verano, sólo el brote que ocurrió en el 2014 se registró durante la temporada de invierno, más sin embargo, fue de menor intensidad al compararlo con los mencionados anteriormente. Esto evidencia que los brotes en el estado de Yucatán se comportan como en las regiones subtropicales con circulación baja durante todo el año y dos picos epidémicos durante la primavera y verano,⁷¹ un patrón epidemiológico que se observó con el nuevo virus de influenza A(H1N1)pdm09.^{72,73} Una observación interesante fue que durante las temporadas de vacunación del período 2013-2016, no se detectaron brotes de influenza o el número de casos fue casi nulo como ocurrió en 2014 y 2015 lo que indica que la aplicación de la vacuna en esas temporadas puede reducir la eficiencia debido que los títulos de anticuerpos de la población no se encuentran en los niveles máximos cuando inician los brotes.

Se sabe que los títulos de anticuerpos dirigidos a la HA de influenza aumentan semanas posteriores a la infección y después disminuyen con el tiempo; en el caso de la vacunación se alcanza aproximadamente 2 semanas después de la inmunización con niveles máximos de 4-6 semanas.⁷⁴ Algunos estudios sugieren que las respuestas inducidas por vacunación se mantienen en niveles altos en personas ≥ 60 años durante al menos 4 meses;⁷⁵ otros estudios han señalado que los títulos detectados en los ensayos de IHA

persisten por encima de los niveles “seroprotectores” (títulos \geq 1:40) durante muchos meses después de la vacunación en una alta proporción de individuos, incluyendo poblaciones de alto riesgo y de adultos mayores.⁷⁶ Un adecuado período de administración de la vacuna puede mejorar las tasas de seroprotección hasta un 91.2 % después de un mes⁷⁷ y la eficacia de la vacuna puede ser tan alta como un 86 % cuando los virus circulantes y las vacunas están bien relacionadas.⁷⁸

Aunque una alta fracción de la población mexicana está presumiblemente protegida contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 por exposición natural desde el año 2009 (niños y adultos jóvenes), inmunidad previa (personas de la tercera edad) y por vacunas pandémicas,⁷⁹ una parte de nuestra población de estudio no presentó títulos de anticuerpos protectores cuya proporción varió con aumentos y decrementos en un rango del 48 % hasta el 31 %, presumiblemente producto de la alta y baja circulación del virus de influenza durante el período 2013-2016 en nuestro estado. Sin embargo, la considerable proporción de la población que no presenta títulos de anticuerpos protectores puede ser también explicado debido que las muestras analizadas en nuestro estudio, al tratarse de sueros pertenecientes a pacientes donadores de sangre (grupo de edad 18-65 años) no se encuentran dentro del Esquema Nacional de Vacunación que incluyen a menores de 6 a 59 meses, personas con factores de riesgo de 5 a 59 años y personas de más de 60 años.

Con respecto al análisis de la relación antigénica, a pesar que los virus aislados en los años 2013 y 2016 presentaron mutaciones que se localizaron en sitios antigénicos y/o en regiones cercanas al sitio de unión al receptor, al reaccionar con el antisuero de referencia con títulos de IHA de 1:1280 sugiere que las mutaciones en HA no los hacen antigénicamente diferentes y por tanto comparten similitud antigénica con la cepa de referencia Cal/07/09. De las mutaciones identificadas en las cepas aisladas del año 2013, la A141T se

reportó por primera vez en el mes de septiembre del año 2009 y se ha detectado en 13 países en el 0.31 % de las secuencias de HA mientras que la mutación S162I se reportó en el mes de mayo del año 2009 y se ha localizado solamente en el 0.07 % de las secuencias en 8 países, ambas mutaciones se han asociado con sitios de reconocimiento de anticuerpos. A pesar de que las muestras aisladas del año 2016 son las que tuvieron más mutaciones en sitios antigénicos (S162N, K163Q, S185T y S203T) y en regiones cercanas al sitio de unión al receptor (I216T, A256T, K282E), S162N es la que tiene mayor importancia porque crea un nuevo sitio potencial de N-glicosilación en la posición 162 que puede afectar la antigenicidad y otras propiedades de la cepa, sin dejar de mencionar que ha sido identificada en el 13.94 % de las secuencias de HA.⁸⁰

Debido a la evolución de la mayoría de los virus de influenza A(H1N1)pdm09, desde septiembre de 2015 se clasificaron en el grupo genético 6B y en dos subgrupos emergentes, 6B.1 y 6B.2.⁵⁹ Aunque los virus (H1N1)pdm09 han adquirido varias mutaciones en la glicoproteína HA, el aislado viral Cal/07/09 aún permanece en la actual vacuna contra la influenza estacional en la región del hemisferio norte,⁸¹ no obstante, para que exista cambio antigénico sustancial se requiere por lo menos cuatro sustituciones de aminoácidos ubicados entre dos o más sitios antigénicos diferentes, es decir, sustituciones en o cerca del RBS pueden influir en las propiedades antigénicas de los virus de influenza A(H1N1)pdm09.^{26, 27} Sin embargo, debido que en el hemisferio sur los ensayos de IHA con antisueros de hurón indicaron que casi todos los virus de influenza recientes eran antigénicamente diferentes del virus de la vacuna Cal/07/09, la OMS recomendó que las vacunas de la temporada del 2017 deben contener la cepa A/Michigan/45/2015 de tipo A(H1N1)pdm09.⁸²

Este trabajo, es el primero en su tipo en utilizar cartogramas antigénicos en México para analizar la relación antigénica entre los sueros de humanos

colectados durante el período 2013-2016 y virus de influenza A(H1N1)pdm09; además, estos resultados darán la pauta para la utilización de esta herramienta en la identificación de diferencias antigénicas entre los virus. Así, a pesar que en el cartograma antigénico elaborado con suero de hurón las distancias antigénicas entre las cepas del 2013 y la cepa del 2016 con respecto a la cepa Cal/07/09 fueron la mismas, al utilizar muestras de suero de humanos del período 2013-2016 se encontraron diferentes distancias antigénicas entre los virus las cuáles fueron ≤ 4 unidades antigénicas, siendo la cepa Yuc/152/13 la que tuvo mayor distancia y la cepa Yuc/12017/16 la que tuvo menor con respecto a la cepa vacunal; sin embargo, tanto el cartograma elaborado con suero de hurón, como aquellos elaborados con sueros de humano permiten llegar a la misma conclusión que los virus son antigénicamente similares con respecto a la cepa vacunal.

Las diferencias entre el mapa elaborado con suero de hurón y aquellos realizados con muestras de suero humano se debe a que el primero abarca un rango antigénico mayor lo cual puede deberse a los protocolos de inoculación y que la recolección de suero ha sido optimizado para producir títulos altos;⁴⁷ de hecho para producir sueros de referencia estándar para la vigilancia de influenza y selección de la cepa vacunal solo se utilizan hurones seronegativos que no han tenido infecciones por influenza, por el contrario, la inmunidad humana está formada en gran parte por infecciones previas de influenza y/o la historia de vacunación.^{83,84} Además, los anticuerpos humanos específicos para los virus (H1N1)pdm09 se centran principalmente en el sitio de unión al receptor de HA1 y la región de tallo,^{82,83} mientras que los anticuerpos anti-(H1N1)pdm09 de hurón se dirigen principalmente al sitio antigénico Sa variable de HA,⁸⁵ todo esto sugiere que el proceso de inmunidad del hurón es diferente al de los humanos a pesar de que tienen tracto respiratorio similar.⁸⁶ A pesar de las diferencias entre el suero de hurón obtenido experimentalmente y los sueros humanos obtenidos bajo condiciones menos controladas, los de hurón son

capaces de proporcionar información útil sobre las diferencias antigénicas generales entre cepas virales.⁴⁷

Otra información obtenida de los cartogramas antigénicos mostró que de acuerdo a las distancias que existen entre las muestras de suero y la cepa de referencia, se conoce que entre el 2013-2015 el porcentaje de muestras que tuvieron protección fue del 55-57 % (≤ 5 unidades antigénicas) mientras que por el contrario en el año 2016 cerca del 50 % de las muestras no poseen títulos de anticuerpos protectores contra la cepa vacunal Cal/07/09 y se encuentran susceptibles a infecciones por virus de influenza A(H1N1)pdm09. Un estudio realizado en México después de la pandemia de influenza A(H1N1)pdm09 en el que se empleó suero de pacientes de junio-septiembre del 2010, encontró que a pesar de la alta transmisión del virus pandémico observado inmediatamente después de la emergencia y de la extensiva vacunación, más de mitad de la población mexicana ha permanecido potencialmente susceptible a la infección por el virus de influenza A(H1N1)pdm09 debido a que tuvieron títulos de anticuerpos por debajo del umbral de protección e incluso este patrón se observó durante las temporadas de influenza del 2011-2012 y 2013-2014.⁸⁷

Hubo varias limitaciones en nuestro estudio. La primera fue la población que se utilizó, debido que, al tratarse de muestras de suero de pacientes donadores de sangre, éstos tuvieron edades entre 18-65 años, con mayor predominancia de adultos jóvenes, tomando en cuenta los criterios que utiliza el banco de sangre, mientras tanto se omitieron individuos de los extremos de la vida que son los más afectados en las infecciones por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09. El segundo es, que debido a cuestiones de Bioética para asegurar la protección de datos no se tuvo acceso a información personal y clínica de los pacientes que pudieran de alguna manera relacionar la información con los resultados obtenidos en esta investigación y así ofrecer información más concreta. La tercera, a pesar que nuestros resultados solo

representan el 0.03 % de la población del estado de Yucatán, se pudo observar que existe una clara relación entre los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 y la frecuencia de influenza estacional durante el período 2013-2016. Sin demeritar los excelentes resultados que se obtuvieron en esta investigación, una población de estudio más grande podría haber dado argumentos y resultados más sólidos para que los Servicios de Salud consideren la importancia de llevar a cabo una vigilancia epidemiológica y virológica de manera específica para la región, así como la apropiada implementación de los programas anuales de vacunación debido al particular comportamiento de los brotes epidémicos de influenza en nuestro estado con respecto al resto del país, que permitan a los pacientes desarrollar una respuesta inmune antes de la exposición al virus de manera que se reduzca la incidencia e impacto del virus de la influenza.

IX. CONCLUSIÓN

1. Más del 50 % de una muestra de sueros residuales recolectadas de pacientes principalmente de la ciudad de Mérida, durante el período 2013-2016 tuvieron títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 y la mayoría de éstos fueron protectores.

2. Se determinó que el número de personas con títulos de anticuerpos protectores contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09, correlacionó con los brotes de influenza estacional en Yucatán durante el período 2013-2016 y se mantuvieron estables durante meses mientras los virus circulantes no sufrieron mutaciones significativas en el gen de HA.

3. A pesar que los virus aislados en Yucatán en los años 2013 y 2016 tuvieron mutaciones en el gen de HA en sitios antigénicos y/o en regiones cercanas al sitio de unión al receptor, antigénicamente son similares a la cepa vacunal Cal/07/09.

4. Con los cartogramas antigénicos elaborados a partir de títulos de anticuerpos detectados en sueros de humano del período 2013-2016 se pudo analizar que los virus aislados en el 2013 y 2016 son antigénicamente similares al virus de referencia Cal/07/09; sin embargo, también se encontró que actualmente en el 2016, casi la mitad de las muestras analizadas no poseen los títulos de anticuerpos protectores contra la cepa vacunal.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud: nota descriptiva. [Internet]. OMS; [updated 2016 Nov; cited 2016 Dec 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/es/> Spanish.
2. Azziz E, Dao C, Nasreen S, Bhuiyan M, Mah S, Al A, et al. Seasonality, timing, and climate drivers of influenza activity worldwide. *J Infect Dis.* 2012;206(6):838-46.
3. Ayora G, Góngora R, López I, Moguel W, Pérez H, Vázquez V, et al. Detection of human influenza virus in Yucatan, Mexico. *Rev Invest Clin.* 2002; 54(5):410-4.
4. López I, Flores R, Iguala M, Hernández E, Ayora G. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Epidemiología: Vigilancia epidemiológica semana 44, 1999.* Editorial Grafik. Distrito Federal, México, 1999:1-3.
5. Ayora G. Tras un año de los comienzos de la pandemia de influenza AH1N1. *Revista Biomedica.* 2010;21(1):33-4.
6. Veguilla, V; Hancock, K; Schiffer, J; Gargiullo, P; Lu, X; Aranio, D; et al. Sensitivity and Specificity of Serologic Assays for Detection of Human Infection with 2009 Pandemic H1N1 Virus in U.S. Populations. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(6):2210-5.
7. Bhoumik P, Hughes A. Reassortment of Ancient Neuraminidase and Recent Hemagglutinin in Pandemic (H1N1) 2009 Virus. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(11):1748-50.

8. Vega B, Reyes G. *El virus de la influenza. Neumol Cir Torax.* 2007; 66(Suppl 1):12-14.
9. Michaelis M, Doerr H, Cinatl J. *Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door. Med Microbiol Immunol.* 2009; 198(3):175-83.
10. Talledo M, Zumaeta K. *Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. Rev Peru Biol.* 2009; 16(2):227-38.
11. Vaqué J, Gil J, Brotons M. *Principales características de la pandemia por el nuevo virus influenza A (H1N1). Med Clin (Barc).* 2009; 133(13):513-21.
12. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Guo Z, et al. *New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. Plos Pathogens.* 2013; 9(10):1-12.
13. Gultyaev A, Fouchier R, Olsthoorn R. *Influenza Virus RNA Structure: Unique and Common Features. Int Rev Immunol.* 2010; 29(6):533-56.
14. Ayora G, Cetina L, Matos A, Romero L. *Hemagglutinin variants of influenza A(H1N1)pdm09 virus with reduced affinity for sialic acid receptor. Arch Virol.* 2014; 159(5):1207-11.
15. Skehel J, Wiley D. *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annu Rev Biochem.* 2000; 69(1):531-69.
16. Xuan C, Shi Y, Qi J, Zhang W, Xiao H, Gao G. *Structural vaccinology: structure-based design of influenza A virus hemagglutinin subtype-specific subunit vaccines. Protein Cell.* 2011; 2(12):997-1005.

17. Brownlee G, Fodor E. *The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356(1416):1871-6.
18. Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, Takada A. *Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. PLoS One.* 2010; 5(1):1-8.
19. De la Rosa D, Vázquez J, Avila S, Carranco A, Ormsby C, Cummings C, et al. *Molecular characterization of the predominant influenza A(H1N1)pdm09 virus in Mexico, December 2011-February 2012. PLoS One.* 2012; 7(11):1-10.
20. Heithoff D, Mahan M. *Pandemic influenza virus: tracking a three-headed monster. Virulence.* 2015; 6(5):405-6.
21. Alexander M, Kobes R. *Effects of vaccination and population structure on influenza epidemic spread in the presence of two circulating strains. BMC Public Health.* 2011; 11(Suppl 1):1-14.
22. Radomski J, Płoński P, Zagórski W. *The hemagglutinin mutation E391K of pandemic 2009 influenza revisited. Mol Phylogenet Evol.* 2014; 70(1):29-36.
23. Hensley S, Das S, Bailey A, Schmidt L, Hickman H, Jayaraman A, et al. *Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift. Science.* 2009; 326(5953):734-36.
24. Caton A, Brownlee G, Yewdell J, Gerhard W. *The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). Cell.* 1982; 31(2 Pt 1):417-27.

25. Koel B, Burke D, Bestebroer T, Van der Vliet S, Zondag G, Vervaet G, et al. *Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. Science. 2013; 342(6161):976-9.*
26. Dinis J, Florek N, Fatola O, Moncla L, Mutschler J, Charlier O, et al. *Deep Sequencing Reveals Potential Antigenic Variants at Low Frequencies in Influenza A Virus-Infected Humans. J Virol. 2016; 90(7):3355-65.*
27. Koel B, Mögling R, Chutinimitkul S, Fraaij P, Burke D, Van Der Vliet S, et al. *Identification of amino acid substitutions supporting antigenic change of influenza A(H1N1)pdm09 viruses. J Virol. 2015; 89(7):3763-75.*
28. Klimov A, Garten R, Russell C, Barr I, Besselaar T, Daniels R, et al. *WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011. Vaccine. 2012; 30(45):6461-71.*
29. European Centre for Disease Prevention and Control. *Influenza Virus Characterisation, Summary Europe, September 2016; [updated 2016 Dec 15; cited 2017 May 17]. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/influenza-virus-characterisation-september-2016.pdf>.*
30. Ramos I, Fernandez-Sesma A. *Modulating the innate immune response to influenza A virus: potential therapeutic use of anti-inflammatory drugs. Frontiers In Immunology. Front Immunol. 2015; 6(361):1-19.*

31. Camacho A, Cazelles B. Does homologous reinfection drive multiple-wave influenza outbreaks? Accounting for immunodynamics in epidemiological models. *Epidemics*. 2013 Dec; 5(4):187-96.
32. Wang J, Bowen G, Padden C, Cerny A, Finberg R, Newburger P, et al. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus Phagocytes. *Blood*. 2008; 112(5):2028–2034.
33. Sanderson S, Thoman M, Kis K, Virts E, Herrera E. Innate Immune Induction and Influenza Protection Elicited by a Response-Selective Agonist of Human C5a. *PLoS ONE*. 2012; 7(7):1-12.
34. Hashimoto Y, Moki T, Takizawa T, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-Infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice. *J Immunol*. 2007; 178(4):2448-57.
35. Lee N, Wong C, Chan P, Chan M, Wong R. Cytokine Response Patterns in Severe Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza among Hospitalized Adults. *PLoS ONE*. 2011; 6(10):1-10.
36. Lee, H, Topham D, Park Y, Hollenbaugh J, Treanor J, Mosmann T, et al. Simulation and Prediction of the Adaptive Immune Response to Influenza A Virus Infection. *J Virol*. 2009; 83(14):7151-65.
37. Sridhar S, Brokstad K, Cox R. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2015; 3(2):373-89.

38. Sridhar S, Begom S, Hoschler K, Bermingham A, Adamson W, Carman W, et al. Longevity and determinants of protective humoral immunity after pandemic influenza infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191(3):325-32.
39. Cargnelutti D, Sánchez M, Mattion N, Scodeller E. Development of a universal CTL-based vaccine for influenza. *Bioengineered*. 2013; 4(6):374-8.
40. Soema P, van Riet E, Kersten G, Amorij J. Development of cross-protective influenza A vaccines based on cellular responses. *Front Immunol*. 2015; 6(237):1-10.
41. Truelove S, Zhu H, Lessler J, Riley S, Read J, Wang S, et al. A comparison of hemagglutination inhibition and neutralization assays for characterizing immunity to seasonal influenza A. *Influenza Other Respir Viruses*. 2016; 10(6):518-24.
42. Stephenson I, Das R, Wood J, Katz J. Comparison of neutralising antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study. *Vaccine*. 2007; 25(20):4056-63.
43. Wood J, Major D, Heath A, Newman R, Höschler K, Stephenson I, et al. Reproducibility of serology assays for pandemic influenza H1N1: collaborative study to evaluate a candidate WHO International Standard. *Vaccine*. 2012; 30(2):210-7.
44. Zhipeng C, Tong Z, Xiu-Feng W. A Computational Framework for Influenza Antigenic Cartography. *PLoS Comput Biol*. 2010; 6(10):1-14.
45. Cai Z, Zhang T, Wan X. Concepts and applications for influenza antigenic cartography. *Influenza Other Respir Viruses*. 2011; 5(Suppl 1):204-7.

46. Lewis N, Kitikoon P, Vincent A, Gramer M. Using antigenic cartography to quantify antigenic evolution in swine influenza A viruses and for vaccine strain selection. Retrieved from the University of Minnesota. 2012; 39(1):35-39.
47. Fonville J, Fraaij P, Mutsert G, Wilks S, Van R, Fouchier R, et al. Antigenic Maps of Influenza A(H3N2) Produced With Human Antisera Obtained After Primary Infection. *J Infect Dis.* 2015; 367(1):1-9.
48. Barnett J, Yang J, Cai Z, Zhang T, Wan X. AntigenMap 3D: an online antigenic cartography resource. *Bioinformatics.* 2012; 28(9):1292-93.
49. Bedford T, Suchard M, Lemey P, Dudas G, Gregory V, Hay A, et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *Elife.* 2014; 3(e01914):1-26.
50. Ayora G, Flores G, Gómez J, González R, Conde L, Puerto M, et al. Influenza seasonality goes south in the Yucatan Peninsula: The case for a different influenza vaccine calendar in this Mexican region. *Vaccine.* 2017; 35(36):4738-44.
51. Arjimon J, Jiménez J. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica. Chapter 4: Clasificación de los tipos de estudio. 4ta edición, Editorial Elsevier. Barcelona, España, 2013: 29-32.*
52. Ayora G, Cadavieco J, Canul A. Serologic Evidence of Human and Swine Influenza in Mayan Persons. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(1):158-60.
53. Velasco V, Martínez V, Roiz J, Huazano F, Nieves A. *Muestreo y tamaño de muestra: una guía práctica para personal de salud que realice investigación.*

Chapter 3: Estudios descriptivos. 1era edición, Editorial E-libro.net. Buenos Aires, 2003: 44-7.

54. WHO Global Influenza Surveillance Network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [Internet]. World Health Organization; [updated 2015; cited 2015 Nov 02]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf.

55. AccessQuick™ RT-PCR System [Internet]. Promega; [updated 2016; cited 2016 Jun 30]. Available from: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/a/accessquick%20rt-pcr%20system%20protocol.pdf>.

56. SYBR™ Safe DNA Gel Stain [Internet]. Invitrogen; [updated 2015; cited 2016 Jul 2]. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/sybr_safe_dna_gel_stain_manual.pdf.

57. QIAquick® Spin Handbook [Internet]. Qiagen; [updated 2013; cited 2016 Jul 2]. Available from: <https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=3987caa6-ef28-4abd-927e-d5759d986658&lang=en>.

58. Antigenic Cartography [Internet]. ACMACS; [updated 2007; cited 2017 May 15]. Available from: <http://www.antigenic-cartography.org>.

59. Friedman N, Drori Y, Pando R, Glatman-Freedman A, Sefty H, Bassal R. A(H1N1)pdm09 influenza infection: vaccine inefficiency. *Oncotarget*. 2017; 8(20):32856-63.

60. Petrie J, Parkhouse K, Ohmit S, Malosh R, Monto A, Hensley S. Antibodies Against the Current Influenza A(H1N1) Vaccine Strain Do Not Protect Some Individuals From Infection With Contemporary Circulating Influenza A(H1N1) Virus Strains. *J Infect Dis.* 2016; 214(12):1947-1951.
61. Bednarska K, Nowak M, Kondratiuk K, Hallmann E, Brydak L. Incidence of Circulating Antibodies Against Hemagglutinin of Influenza Viruses in the Epidemic Season 2013/2014 in Poland. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 857(12):45-50.
62. Aguilar G, Castelán J, Juárez C, Ribas R, Estrada I, Baltierra L. Seroprevalence of Pandemic A(H1N1) pmd09 Virus Antibodies in Mexican Health Care Workers Before and After Vaccination. *Arch Med Res.* 2015; 46(2):154-63.
63. Valero N, Pérez M, Villasís M, Núñez A, Boscó I, Lozano B. Antibody Persistence in Adults Two Years after Vaccination with an H1N1 2009 Pandemic Influenza Virus-Like Particle Vaccine. *PLoS One.* 2016; 11(2):1-13.
64. Hsu J, Zhao X, Chen M, Cook A, Lee V, Lim W, et al. Rate of decline of antibody titers to pandemic influenza A (H1N1-2009) by hemagglutination inhibition and virus microneutralization assays in a cohort of seroconverting adults in Singapore. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1):414.
65. Duy N, Todd S, De Bruin E, Nhu T, Thao N, Minh T, et al. Structure of general-population antibody titer distributions to influenza A virus. *bioRxiv.* 2016; 7(1):1-24.
66. Lessler J, Riley S, Read J, Wang S, Zhu H, Smith G, et al. Evidence for antigenic seniority in influenza A (H3N2) antibody responses in southern China. *PLoS Pathog.* 2012; 8(7):e1002802(1-11).

67. Nhat N, Todd S, de Bruin E, Thao T, Vy N, Quan T, et al. Structure of general-population antibody titer distributions to influenza A virus. *Sci Rep.* 2017; 7(1):1-9.
68. Ross T, Hairong L, Chia B, Hill E, Weirback H, Zimmer S. Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses during the 2009-2010 and 2010-2011 influenza seasons in residents of Pittsburgh, PA, USA. *PLoS Curr.* 2011; 3(1):1-43.
69. Guiomar R, Pereira da Silva S, Conde P, Cristóvão P, Maia A, Pechirra P, et al. Cross-protection to new drifted influenza A(H3) viruses and prevalence of protective antibodies to seasonal influenza, during 2014 in Portugal. *Vaccine.* 2017; 35(16):2092-99.
70. Delabre R, Salez N, Lemaitre M, Leruez-Ville M, de Lamballerie X, Carrat F. Antibody persistence and serological protection among seasonal 2007 influenza A(H1N1) infected subjects: Results from the FLUREC cohort study. *Vaccine.* 2015; 33(49):7015-21.
71. Ayora G, Góngora R, López I, Moguel W, Pérez H, Vázquez V, et al. Detection of human influenza virus in Yucatan, Mexico. *Rev Invest Clin.* 2002; 54(5):410-4.
72. Chowell G, Echevarría S, Viboud C, Simonsen L, Tamerius J, Miller M, et al. Characterizing the epidemiology of the 2009 influenza A/H1N1 pandemic in Mexico. *PLoS Med.* 2011; 8(5):e1000436.

73. Ayora G, Betancourt M, Gómez J, Conde L, González R, Manrique M, et al. *Epidemiologic study of human influenza A(H1N1)pdm09 virus in Yucatan, Southern Mexico. Rev Biomed. 2012; 23(2):39-46.*
74. Petrie J, Ohmit S, Johnson E, Truscon R, Monto A. *Persistence of Antibodies to Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Following One or Two Years of Influenza Vaccination. J Infect Dis. 2015; 212(12):1914-22.*
75. Skowronski D, Tweed S, De Serres G. *Rapid decline of influenza vaccine-induced antibody in the elderly: is it real, or is it relevant? J Infect Dis. 2008; 197(4):490-502.*
76. Moran J, Rose W, Darga A, Rohde K, Hayney M. *Persistence of influenza vaccine-induced antibodies in lung transplant patients between seasons. Transpl Infect Dis. 2011; 13(5):466-70.*
77. Kang E, Eun B, Kim N, Kim Y, Lim J, Kim D. *Hemagglutination inhibiting antibody persistence 1 year after influenza vaccination in Korean children and adolescents. Hum Vaccin Immunother. 2017; 13(4):895-902.*
78. Bridges C, Thompson W, Meltzer M, Reeve G, Talamonti W, Cox N, et al. *Effectiveness and cost-benefit of influenza vaccination of healthy working adults: A randomized controlled trial. JAMA. 2000; 284(13):1655-63.*
79. Dávila J, Chowell G, Borja V, Viboud C, Grajales Muñiz C, Miller M. *Substantial Morbidity and Mortality Associated with Pandemic A/H1N1 Influenza in Mexico, Winter 2013-2014: Gradual Age Shift and Severity. PLoS Curr. 2014; 6(1):1-17.*

80. *Influenza Surveillance-prepared for the next wave. Flusurver; [updated 2017 May 15; cited 2017 May 22]. Available from: <http://flusurver.bii.a-star.edu.sg>*

81. *Linderman S, Chambers B, Zost S, Parkhouse K, Li Y, Herrmann C, et al. Potential antigenic explanation for atypical H1N1 infections among middle-aged adults during the 2013-2014 influenza season. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(44):15798-803.*

82. *World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the in the 2017 southern hemisphere influenza season. Available at: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201609_recommen-ndation.pdf?ua=1. Accessed 9 May 2017.*

83. *Wrammert J, Koutsonanos D, Li G, Edupuganti S, Sui J, Morrissey M, et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. J Exp Med. 2011; 208(1):181-93.*

84. *Li G, Chiu C, Wrammert J, McCausland M, Andrews S, Zheng N, et al. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(23):9047-52.*

85. *Chen Z, Wang W, Zhou H, Suguitan AL Jr, Shambaugh C, Kim L, et al. Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. J Virol. 2010; 84(1):44-51.*

86. *Xie H, Wan X, Ye Z, Plant E, Zhao Y, Xu Y, et al. H3N2 Mismatch of 2014-15 Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison*

between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps. Sci Rep. 2015; 5(1):1-10.

87. *Veguilla V, López H, López I, Aparicio R, Barrera G, Rojo J, et al. A Large Proportion of the Mexican Population Remained Susceptible to A(H1N1)pdm09 Infection One Year after the Emergence of 2009 Influenza Pandemic. PLoS One. 2016; 11(3):1-9.*