

Secuenciación de virus de la gripe estacional aplicada a la Salud Pública

Aitor García Anaya

Tutor de la asignatura: Ricardo Cordero Otero

Tutor del trabajo: María Montserrat Poblet Icart

Tutor del laboratorio: Xavier López

Trabajo de fin de grado

Graduado en Biotecnología, Universitat Rovira i Virgili

Tarragona, Septiembre de 2018

Agradecimientos

En la culminación de mis estudios deseo dedicarle unas palabras de agradecimiento a todas esas personas que me han ayudado a recorrer el camino. No solo han contribuido en mi desarrollo científico, también en mi forma de contemplar el mundo.

Me gustaría agradecer a Xavier López por acogerme bajo su tutela y darme la oportunidad de sentir en mis pieles la emoción que se cultiva en el laboratorio.

A las doctoras Laia Vegue, Flor Gimeno, María Cuenca y Paqui por ser un foco de inspiración y constituir el tipo de científico que un día me gustaría llegar a ser.

A mis referencias en el resto de aspectos de la vida les digno mi más sincera gratitud. Neus, Panu, Ubeda, Ari y Dani, gracias por vuestras lecciones.

Un especial abrazo a mis profesoras Ana Alpiste y Carmen Flores que con mucho ahínco plantaron la semilla de la curiosidad científica en mi mente, a Carlos Casterá por hacerla brotar y a David Valero por traer la primavera que la ha hecho florecer.

Y en general a todo el mundo que ha confiado en mí, muchas gracias. Estas líneas son también vuestras.

Índice

I.	Introducción.....	8
	Resumen.....	8
	1.1 Gripe.....	9
	1.2 Vacuna.....	10
	1.3 HA y NA.....	11
	1.4 Sitios antigénicos de HA.....	13
	1.5 Glicosilación.....	15
	1.5 Sistema de vigilancia.....	17
II.	Hipótesis del trabajo y objetivos.....	18
	Metodología:.....	18
	Diseño del estudio.....	18
	Recogida y transporte de muestras.....	19
	Extracción de ARN.....	19
	Cribado.....	19
	Tipado y subtipado.....	20
	RT-PCR en dos pasos.....	21
	Electroforesis.....	22
	Purificación.....	22
	Alineamiento de secuencias.....	23
	Resultados y discusión.....	23
	Análisis de mutaciones.....	23
	Estructura tridimensional.....	26
	Glicosilación.....	30
	Discusión de los resultados.....	33
	Conclusión.....	35
	Autoevaluación.....	36
	Referencias.....	37
III.	Anexos.....	44
	Tablas de mutaciones.....	44

Datos del centro

La Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) forma parte de red mundial de gripe hospitalaria (GHISN). Este proyecto está enfocado en la detección de gripe A y B de pacientes hospitalizados por infecciones respiratorias. Una vez detectados los virus de la gripe, se secuencian para estudiar las mutaciones y cambios en aminácidos de la glicoproteína hemaglutinina (HA).

Los resultados se incluyen en una base de datos mundial, a partir de la cual se elabora un árbol filogenético que permite visualizar la evolución del virus y su circulación en la población.

El área de genómica y salud de FISABIO hace una distinción de pacientes vacunados y no vacunados con tal de estudiar la incidencia de la gripe en ambos grupos y la efectividad de la vacuna.

En este trabajo se caracterizan las muestras para distinguirlas de otros virus respiratorios y se analizan las mutaciones para prever cambios en la estructura tridimensional de HA, que a su vez condicionarán la especificidad de los anticuerpos (producidos por la inmunidad inducida por la vacuna) contra los virus en circulación.

I. Introducción

Resumen

El objetivo de este trabajo es evaluar la efectividad de la vacuna anual contra la gripe. Para ello, primero se han identificado los virus en muestras nasofaríngeas de pacientes hospitalizados y se han caracterizado las muestras de gripe. Una vez conocido el tipo y subtipo de cada muestra se ha realizado una RT-PCR para obtener ADN complementario (ADNc) de la glicoproteína hemaglutinina (HA), diana de los anticuerpos generados en la vacunación, la cual posteriormente se ha secuenciado. Se han comparado las secuencias de las muestras con las secuencias de las cepas incluidas en la vacuna anual.

El estudio de las mutaciones ha permitido diferenciar las muestras en grupos o clados que comparten mutaciones. La capacidad de evasión del virus a los anticuerpos producidos tras la exposición a la vacuna se ha evaluado a partir de las mutaciones en residuos localizados en epítomos de la HA y variaciones del potencial de glucosilación.

La diferenciación de 2 clados principales del virus A/H3N2 con múltiples mutaciones en epítomos de la HA y la aparición de un nuevo clado de B/Victoria caracterizado por poseer una delección de dos aminoácidos, sugirió que la vacuna de la temporada 2018-2019 debía ser actualizada. Por otra parte, los virus A/H1N1pdm09 y B/Yamagata mostraron baja variación, por lo que no parecía necesario actualizar las cepas incluidas en la vacuna.

Palabras clave: *gripe, epítomo, mutación, glucosilación, vacuna*

1.1 Gripe

La gripe es una enfermedad respiratoria contagiosa causada por un virus ARN de cadena sencilla y polaridad negativa (grupo V de Baltimore), perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. En España la temporada de epidemia empieza en octubre y se intensifica a final de diciembre y principio de enero. Tras un periodo de incubación de entre 1 y 4 días se manifiestan los primeros síntomas: fiebre, tos seca, mucosidad nasal, fatiga y dolores de garganta, cabeza, musculares y corporales. La gripe de temporada infecta entre el 5% y 15% de la población global cada año (Stöhr, 2002). En España la tasa de incidencia superó en nivel basal (55,68 casos por 100.000 habitantes) la semana 50/2016 y llegó a un máximo (229,10 casos por 100.000 habitantes) la semana 3/2017 (Grupo de Vigilancia de Gripe, 2017). Anualmente fallecen 500.000 personas en todo el mundo debido a complicaciones como la bronquitis, siendo la más frecuente la neumonía (Chan & World Health Organization, 2009).

Los virus de la gripe se divide en tipos (A, B, C) y subtipos distintos. A y B son los responsables de las epidemias estacionales (B.L., 2003). La gripe A es un ejemplo de zoonosis. Las primeras cepas se originaron en aves y se transmitieron a humanos, donde evolucionan independientemente. (Russell et al., 2014). La gripe B circula exclusivamente en humanos. Los virus de la gripe C causan infecciones con síntomas leves (Zambon, 1999) y los virus D infectan principalmente al ganado bovino, no suponiendo una amenaza para humanos (Su, Fu, Li, Kerlin, & Veit, 2017).

Los subtipos de gripe A se nombran en función de la glicoproteína HA y NA. Las combinaciones que se encuentran en circulación en humanos son A/H1N1, A/H2N2 y A/H3N2. La variante en circulación de A/H1N1 (A/H1N1pmd09) data de la pandemia del año 2009, conocida como "gripe porcina", por su origen zoonótico. A/H3N2 se diferenció a partir de A/H2N2 en el año 1968, ocasionando la pandemia de "Hong Kong". Los linajes de gripe B en circulación son B/Yamagata (B/yam) y B/Victoria (B/vic), diferenciados filogenéticamente por las secuencias de sus genes HA y NA.

En la temporada 2016-2017 en España se detectaron 11.712 casos de gripe. De las 2.140 detecciones centinela de gripe, el 98,6% fueron gripe A, y de ellos el 99,7% correspondían al subtipo H3N2. De las 809 caracterizaciones de virus de gripe A/H3N2 que se realizaron, el 78% coincidía con el grupo o clade 3C.2a1 (A/Bolzano/7/2016) y el 20% con el clade 3C.2a (A/Honkong/4801/2014), siendo el 2% restante otros grupos. El 88% de los virus de gripe B en circulación se asemeja al linaje utilizado en la vacuna (B/Brisbane/60/2008) (Grupo de Vigilancia de Gripe, 2017)

1.2 Vacuna

El método más efectivo para prevenir la gripe es mediante la vacunación de la población (Gasparini et al., 2002; WHO, 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la vacunación de grupos de riesgo. La infección por gripe puede agravar problemas de salud crónicos como por ejemplo la insuficiencia cardíaca o el asma. Se incluye en este grupo a aquellas personas susceptibles de contraer la enfermedad o con riesgo de desarrollar complicaciones: trabajadores del ámbito sanitario; embarazadas; sujetos con condiciones de salud comprometidas y personas mayores de 65 años (Costantino & Vitale, 2016). La mediana de edad de las 2.874 hospitalizaciones graves confirmadas por gripe fue de 64 años (Grupo de Vigilancia de Gripe, 2017). Cabe destacar que el 48% de los pacientes de riesgo hospitalizados no habían recibido la vacunación la temporada 2016-2017. (Grupo de Vigilancia de Gripe, 2017) El colectivo de personas mayores de 64 años constituye el 90% de las muertes relacionadas con la gripe (L Simonsen et al., 1998; Lone Simonsen et al., 2005), tiene en la población una media de edad los 81 años. Por otra parte, los grupos de edad más afectados fueron los menores de 0 a 4 años (incidencia máxima de 554,64 casos por cada 100.000 habitantes)

La vacuna administrada en España en otoño-invierno de la temporada 2016-2017 fue trivalente. Incluye componentes inactivados pertenecientes a cepas análogas de A/H1N1pmd09, A/H3N2 y B/Vic (A/Michigan/45/2015, A/Hong Kong/4801/2014 y B/Brisbane/60/2008 respectivamente (World Health

Organization (WHO), 2017). Las cepas se seleccionan en función de su capacidad por inducir la producción de anticuerpos específicos contra las cepas de mayor incidencia en la temporada de gripe anterior. (WHO, 2016; World Health Organization (WHO), 2017) El modo más común para producir los componentes es utilizando un proceso de fabricación basado en la inoculación de huevos embrionados. Las cepas seleccionadas se inyectan con las cepas en cuestión y se incuban para que el virus se replique.

El objetivo de la vacuna es inducir la proliferación de linfocitos B que produzcan anticuerpos contra el virus de la gripe. Mientras que los anticuerpos contra HA previenen la infección de la célula huésped, impidiendo el reconocimiento del virus, los anticuerpos contra NA interfieren en la replicación viral y su propagación. Adicionalmente, los anticuerpos pueden inducir la lisis de las células infectadas mediante la activación de la vía del complemento, citotoxicidad de células dependiente de anticuerpo, o la activación de células NK.

1.3 Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA)

El genoma del virus de la gripe está constituido por 8 segmentos que codifican 12 proteínas distintas. El complejo ribonucleoproteico (RNP) replica y transcribe los segmentos de ARN viral. Este complejo incluye el segmento de unión a la nucleoproteína (NP), involucrada en el importe del ARN al núcleo, y un complejo heterotrimérico polimerasa formado por una polimerasa ácida (PA), una subunidad catalítica de ARN polimerasa dirigida por ARN (PB1) y una proteína básica de la polimerasa 2 (PB2) (Petrova & Russell, 2018). Envolviendo el núcleo del virión se encuentra la proteína multifuncional de matriz M1, que interactúa con RNP regulando así el tránsito de ARN y la formación de la envoltura viral. La proteína de extracción nuclear (NEP o NS2) media la interacción del complejo M1/RNP y la proteína no estructural NS1, involucrada en la exportación de ARN. La variante espliceosómica PB1-F2 induce la muerte celular y PA-X es una RNA endonucleasa que modula la patogenicidad viral. Recientemente se han identificado nuevas proteínas con

un papel importante en el ciclo vital viral (PB1-N40, PA-N155, PA-N182, M42, NS3). Estas proteínas son traducidas en marcos de lectura alternativos a partir de los 8 segmentos génicos.

Las glicoproteínas HA y NA, integradas en la superficie de la bicapa lipídica procedente de la membrana plasmática de la anterior célula huésped, son vitales en el proceso de reconocimiento e infección. La principal función de HA es facilitar la internacionalización del virus ya que su cabeza globular se une al ácido siálico presente en los receptores de la membrana plasmática del huésped. NA habilita la liberación de nuevos viriones de las células infectadas al eliminar el enlace HA-ácido siálico del receptor del huésped.

La proteína HA es un homotrímero formado por monómeros de 549 residuos de aminoácidos. Los monómeros de HA (llamados HA0) están codificados en el segmento de ARN 4. Un péptido señal de 17 aminoácidos que permite la translocación al retículo endoplasmático rugoso (RER). Durante la cotraducción el péptido señal se escinde y se glucosilan los nitrógenos de los residuos de Asn que se encuentran en el motivo Asn-X-Ser/Thr-Y. Sin glucosilar, el monómero tiene una masa molecular de 60kDa. El patrón de glucosilación varía en función de la secuencia de aminoácidos, pudiendo alterarse la estructura tridimensional de la proteína y por lo tanto el reconocimiento por parte de los anticuerpos.

El monómero HA0 es transportado al Aparato de Golgi, donde proteasas celulares realizan un corte en la posición 329, que usualmente se corresponde con una arginina (ocasionalmente lisina), dando lugar a dos fragmentos: HA1(327 aminoácidos) y HA2 (222 aminoácidos). El dominio de la cabeza globular está constituido por los residuos 116-261 de HA1 y se encuentra formando el motivo "jelly-roll" de ocho hojas β antiparalelas, además forma una hendidura poco profunda en la punta distal que actúa como un sitio de unión al receptor rodeado de sitios antigénicos. Comprende un dominio de unión al receptor y un dominio esterasa vestigial. El dominio del tallo está formado por el resto de residuos de HA1 y por los residuos de HA2. Está constituido por una espiral de hélices α de triple cadena, que se extiende 76 Å desde la superficie.

Para que la proteína se ancle a la membrana, HA2 incluye un péptido hidrofóbico formado por 28 residuos formando una hélice, seguido por un tallo citosólico de 10 residuos. Ambos fragmentos, HA1 y HA2, se enlazan mediante puentes disulfuro. (SRIWILAIJAROEN & SUZUKI, 2012)

El virus de la gripe se encuentra en un estado no infeccioso hasta que alcanza el tracto respiratorio o gastrointestinal. Las células de estos tractos sintetizan enzimas proteolíticas similares a la tripsina, que cortan la arginina situada en la posición 329 del péptido HA0. De este modo la HA adopta una conformación activa.

Después de unirse a los receptores de la célula huésped mediante la unión HA-ácido siálico, El virión es endocitado. El bajo PH del endosoma induce un cambio conformacional de HA. Como consecuencia, la membrana viral y la endosomal se fusionan. Finalmente, las RNP virales se liberan al citoplasma. Una vez han entrado en el núcleo los fragmentos de ARN viral (polaridad negativa), éstos se transcriben, mediante la polimerasa del virus, a ARN de polaridad positiva, a partir del cual se realiza la replicación y transcripción vírica.

1.4 Sitios antigénicos de HA

La proteína HA es la principal diana de la respuesta adaptativa al virus de la gripe. La mayoría de las respuestas mediadas por anticuerpos están dirigidas a HA1 y en menor medida a HA2. Mutaciones en el gen HA pueden variar la estructura de sus epítomos, comprometiendo el reconocimiento por parte de los anticuerpos. A este fenómeno se le conoce como deriva antigénica. Los cambios antigénicos permiten que al virus evadir la inmunidad inducida por la vacuna o la memoria inmune intrínseca del hospedante.

De cara a la vacunación, inducir una respuesta inmune mediada por anticuerpos contra HA2, debido a que muestra una elevada conservación de la secuencia supondría un escenario prometedor. Así, un mismo tipo de anticuerpo contra HA2 puede reconocer distintas cepas de gripe. Pero debido a la poca accesibilidad de los epítomos de HA2, este tipo de anticuerpos son

menos prevalentes que los específicos de HA1. Para que se produzcan, normalmente se requiere de vacunaciones repetidas.

La cabeza globular (HA1) es la parte más expuesta de la proteína HA. Su accesibilidad facilita tanto el reconocimiento por el sistema inmunitario como la interacción con los anticuerpos desarrollados. HA1 posee 5 sitios antigénicos, estos conforman la diana de los anticuerpos.

La tabla 1 ilustra los sitios antigénicos, y las posiciones de los residuos que los componen, de HA1 de A/H3N2, A/H1N1PDM09 y B/Yamagata (Mcanerney et al., 2015). Estos sitios antigénicos fueron identificados en el año 1980 utilizando anticuerpos monoclonales y proteína HA (Koel et al., 2013; Skehel et al., 1984). Estos estudios sugieren que la alteración de un residuo de estos sitios antigénicos es suficiente para dar lugar a una variedad antigénica nueva, aunque dependiendo del trasfondo genético en ocasiones son necesarias dos o tres mutaciones.

Tabla 1.1 A/H3 Mapa de los sitios antigénicos y sus residuos (n=131)

Epítipo	Posición de los residuos
A (n=19)	122, 124, 126, 130-133, 135, 137, 138, 140, 142-146, 150, 152, 168
B (n=22)	128, 129, 155-160, 163-165, 186-190, 192-194, 196-198
C (n=27)	44-48, 50, 51, 53, 54, 273, 275, 276, 278-280, 294, 297, 299, 300, 304, 305, 307-312
D (n=41)	96, 102, 103, 117, 121, 167, 170-177, 179, 182, 201, 203, 207-209, 212-219, 226-230, 238, 240, 242, 244, 246-248
E (n=22)	57, 59, 62, 63, 67, 75, 78, 80-83, 86-88, 91, 92, 94, 109, 260-262, 265

Tabla 1.2 A/H1 Mapa de los sitios antigénicos y sus residuos (n=50)

Epítipo	Posición de los residuos
Sa (n=13)	124, 125, 153-157, 159-164
Sb (n=12)	184-195
Ca1 (n=11)	166-170, 203-205, 235-237
Ca2(n=8)	137-142, 221, 222
Cb(n=6)	70-75

Tabla 1.3 B/Yam Mapa de los sitios antigénicos y sus residuos (n=72)

Epítipo	Posición de los residuos
Lazo 120 (n=29)	73-79; 116-137
Lazo 150 (n=10)	141-150
Lazo 160 (n=8)	162-169
Hélice 190 (n=9)	196-204
Región 230 (n=16)	228-243

Tabla 1.4 B/Vic Mapa de los sitios antigénicos y sus residuos (n=72)

Epítipo	Posición de los residuos
Lazo 120 (n=29)	73-79; 116-137
Lazo 150 (n=10)	141-150
Lazo 160 (n=8)	162-170
Hélice 190 (n=9)	197-205
Región 230 (n=16)	229-244

Tabla 1. Mapa de los sitios antigénicos de HA los virus de gripe A/H3N2, A/H1N1pdm09, B/Yam B/Vic. (n=número de residuos) Skowronski et al 2015-16 influenza vaccine effectiveness

Estudios recientes muestran el cambio antigénico del virus A/H3N2 que circuló el año 1968 al del 2003 en el cual hubo una substitución de 7 aminoácidos (posición 145, 155, 156, 158, 159, 189 y 193) cercanos al sitio de unión al receptor permitiendo al virus evadir el sistema inmune. Por otra parte, un estudio reciente ha identificado mediante Detección Mutacional Profunda (DMP) substituciones en posiciones alejadas del epítipo con un rol importante en el escape inmune (Lewis et al., 2011; Linderman et al., 2014).

Teniendo en cuenta la cercanía de los 7 aminoácidos al sitio de unión al receptor, debe haber un equilibrio entre la deriva antigénica y especificidad de unión al ácido siálico ya que su reconocimiento es vital para la entrada viral. De este modo la variabilidad de residuos se ve limitada a unas posiciones concretas, cosa que explica la uniformidad de diferencias antigénicas entre las variedades circulantes (Smith, 2004; Smith et al., 2004). Como ejemplo, en la temporada 2006-2007 se observaron 3 variedades de A/H1N1PDM09 antigénicamente similares en sitios geográficos alejados entre sí (Bedford et al., 2015), todas ellas con una mutación en la posición K140E, inmediatamente adyacente al sitio de unión al receptor. A su vez, A/H3N2 posee un sitio variable en un lugar equivalente.

1.5 Glucosilación

La modificación del patrón de glucosilación de las glicoproteínas HA y NA es otro de los mecanismos responsables de la deriva antigénica (Tate et al., 2014). Los oligosacáridos en la superficie de HA juegan un papel importante en la unión a los receptores celulares, forman parte de los sitios antigénicos de HA y son reconocidos por los anticuerpos (Abe et al., 2004; Medina et al., 2013; Wei et al., 2010). Los glucanos también pueden ser reconocidos por lectinas

filogenéticamente antiguas del sistema inmune innato. Por lo tanto, una modificación puede alterar tanto la efectividad de su infección como la evasión de la inmunidad humoral (Tate et al., 2014).

La naturaleza de los oligosacáridos expresados en los sitios de glucosilación de HA y NA depende de la célula huésped. Estos oligosacáridos pueden ser una mezcla de estructuras terminadas en un azúcar manosa, complejos con ramificaciones terminadas en galactosa y/o *N*-acetyl-galactosamine (GalNAc), u oligosacáridos híbridos (S Basak, Pritchard, Bhowan, & Compans, 1981; Ward & Dopheide, 1981). Además, los glucanos *unidos a N* se pueden sulfatar (Compans & Pinter, 1975). Los glucanos complejos expresados por la HA viral carecen de ácido siálico (SIA) debido a su eliminación por la acción de NA viral (Sukla Basak, Tomana, & Compans, 1985; Kaverin & Klenk, 1999)

Los oligosacáridos se unen mediante un enlace N-glucosídico al residuo asparagina (Asn) del motivo (Asn-X-Ser/Thr-Y), donde cualquier aminoácido a excepción de la prolina puede ocupar la posición X o Y. Dependiendo del aminoácido la probabilidad de que Asn se glucosile varía (Kornfeld, 1985). Si dos sitios potenciales de glucosilación se encuentran cercanos es posible que no se glucosilen debido a un impedimento estérico. Esto también ocurre cuando X o Y es una prolina, por este motivo los motivos Asn-Pro-Ser/Thr o Asn-X-Ser/Thr-Pro son sitios no glucosilados. Algunos ejemplos de inhibición de la glucosilación son la combinación Asn-Leu-Ser o Asn-Glu-Ser o cuando hay un aminoácido concreto en la posición adyacente al motivo de glucosilación como Asn-X-Ser/Thr-Trp o Asn-X-Ser/Thr-Glu (Mellquist, Kasturi, Spitalnik, & Shakin-Eshleman, 1998).

Estudios evolutivos de gripe A/H3N2 y A/H1N1pdm9 indican que desde su emergencia en humanos el número de glucosilaciones en la cabeza globular de HA ha aumentado (Sun, Wang, Zhao, Chen, & Li, 2011) . Sin embargo, los oligosacáridos en la cola de HA se han mantenido invariables. El principal motivo de esta conservación es que los glucanos en la región de la cola son imprescindibles para garantizar su conformación tridimensional (Roberts,

Garten, & Klenk, 1993). La reducción de sitios en esta región tiene como resultado errores en la trimerización de la proteína y su transporte.

1.5 Sistema de vigilancia

Debido a la elevada tasa de mutaciones común en virus de ARN, aparecen nuevas variantes de los virus de la gripe A/H3N2 cada 3-5 años, y de los A/H1N1pdm09 y B cada 3-8 años, siendo necesario actualizar la vacuna cada 3-4 años.

El Sistema centinela de vigilancia de gripe en España (SVGE) nace con el objetivo de establecer un sistema que permita realizar un seguimiento del virus de la gripe y que controle su evolución. El SGVE integra 17 redes de vigilancia pertenecientes a cada comunidad autónoma, a excepción de Galicia y Murcia, 20 laboratorios de microbiología encargados de detectar y caracterizar virus gripales y una serie de unidades e institutos de Salud Pública pertenecientes a las CCAA (anexo del informe) encargados de realizar las labores administrativas.

Así mismo, el SGVE forma parte de la Red de Vigilancia Europea de Gripe (European Influenza Surveillance Network -EISN-), coordinada por el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC).

Bajo la coordinación del Centro Nacional de Epidemiología (CNE) y el Centro Nacional de Microbiología (CNM), el SVGE se encarga de recopilar los datos obtenidos mediante la vigilancia virológica y epidemiológica del virus y su difusión geográfica.

El sistema de vigilancia está centralizado. El del Instituto Carlos III de Madrid (ICIII) evalúa muestras de todo el territorio español, mientras que otros centros como FISABIO brindan apoyo estudiando los casos autonómicos, en este caso

de la Comunidad Valenciana. Semanalmente, el CNE emite un informe que recopila la incidencia de la gripe en las provincias españolas.

II. Hipótesis del trabajo y objetivos

La elevada variación antigénica que presenta el virus de la gripe representa un problema para la Salud Pública. Con el objetivo de dotar a la población de una respuesta inmune humoral capaz de impedir, o en su defecto disminuir, la infección de la gripe, es necesario disponer de una vacuna actualizada.

Con tal de predecir la efectividad que tendrá la vacuna actual en la epidemia de la siguiente temporada, en este estudio:

- Se caracterizará la gripe en circulación
- Se estudiarán las mutaciones de los virus de gripe A (A/H1N1pdm09 y A/H3N2) y B (B/Yam y B/Vic)

En el caso de que se obtengan resultados que pongan en duda la eficacia de la vacuna se sugerirán soluciones.

Metodología:

Diseño del estudio

El estudio se ha realizado con muestras nasofaríngeas pertenecientes a pacientes hospitalizados por infecciones respiratorias. Al estudiar los pacientes graves es posible conseguir información de los virus más virulentos y que representen mayor peligro para la Salud Pública, además de permitir adaptar las vacunas a estas variantes en circulación.

En este estudio han participado los hospitales: Hospital General de Castellón (Castellón), Hospital La Fe (Valencia), Hospital Doctor Peset (Valencia) y

Hospital General de Alicante (Alicante), los cuales brindan servicios sanitarios al 22% de los 4,860,874 habitantes de la Comunidad Valenciana.

Por este motivo, tras la detección, tipado y subtipado de los virus de gripe, se escogieron para secuenciar la hemaglutinina aquellas muestras con valores de *Cycle Threshold* (CP) ≤ 25 en la RT-PCR en tiempo real usada en la detección, indicativo de una elevada carga viral. Con tal de ajustarse al presupuesto del estudio se eligió al azar para secuenciar 1 de cada 4 muestras que cumplieren el criterio.

La metodología seguida en este estudio se basa en los protocolos recomendados por el informe de la OMS (WHO, 2011). Ese informe recoge las prácticas óptimas para caracterizar y secuenciar el virus de la gripe.

Recogida y transporte de muestras

Las muestras nasofaríngeas fueron recogidas utilizando un hisopo flocado, se sumergieron en medio de transporte y se congelaron hasta su transporte al Laboratorio de Virología de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO), siguiendo los procedimientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud OMS (WHO, 2011). Una vez en el laboratorio, se utilizó un 1 ml de los 3 ml de medio de transporte de cada muestra recolectada, para extraer el ARN viral.

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó automáticamente utilizando el instrumento NucliSENS easyMAG, (BioMérieux, Lyon, France) basado en la captura los ácidos nucleicos en microesferas magnéticas de silicio. La extracción se realizó en tandas de 22 muestras y un control negativo (con medio de transporte sin muestra).

Cribado

Para la detección de virus respiratorios se realizan 4 RT-PCR multiplex en tiempo real (RT-PCR) utilizando el instrumento Lightcycler 480II (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) siguiendo las indicaciones de He et al. (He et al., 2009).

La multiplex n°1 distingue virus de la gripe A y B, utilizando pruebas diseñadas para la proteína Matriz (He et al., 2009; Suwannakarn et al., 2008). La n°2 detecta coronavirus humano (HuCoV) 229E, NL63, OC43, y HKU1 utilizando sondas para el gen 1b (Kuypers et al., 2007), metapneumovirus humano (HMPV) A y B utilizando sondas para el gen N (Matsuzaki et al., 2009) y bocavirus humano (hBoV) utilizando sondas para el gen NP1 (Neske et al., 2007). La n°3 virus parainfluenza (PIV) 1, 2, 3, y 4 mediante sondas para el gen HN (van de Pol et al., 2007), Adenovirus (AdV) con sondas para el gen Hexon (van de Pol et al., 2007), y virus respiratorio sincitial (VRS) A ó B estudiando el gen NC (van-de-Pol et al., 2007). La n°4 rinovirus y enterovirus (HRV/ENV) mediante sondas para la región 5' (Tapparel et al., 2009). Se incluyen cebadores y sondas para amplificar y detectar ARN del gen humano para la ribonucleoproteína RNP, que sirve como control interno positivo y de calidad de la muestra.

Tipado y subtipado

Para las muestras positivas de gripe A, se realiza una RT-PCR en tiempo real tanto para confirmar que la muestra es gripe (gen Matriz) como para distinguir los subtipos H3N2, H1N1pdm09 y H1N1 (gen HA). Para muestras positivas de gripe B, se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real para distinguir los linajes B / Yamagata y B / Victoria (gen HA). Se utilizan unos primers y sondas específicos para cada subtipo o linaje. (tabla 2; real-time PCR group protocol #1, WHO molecular diagnosis of influenza virus in humans, August 2011 update)

Tipo/Subtipo	Gen	Cebador	Secuencia
Control positivo	Matriz (RNP)	MP-39-67For	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
		MP-183-153Rev	TGACAGRATYGGTCTTGCTTTAGCCAYTCCA
		MP-96-75ProbeAs	5'-FAM-ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG-MGB-3'
A(H3N2)	HA	NIID-H3 TMPrimer-F1	CTATTGGACAATAGTAAAACCGGGRGA
		NIID-H3 TMPrimer-R1	GTCATTGGGRATGCTTCCATTTGG
		NIID-H3 Probe1	5'-Cy3-AAGTAACCCCKAGGAGCAATTAG-MGB-3'
A(H1N1pmd09)	HA	NIID-swH1 TMPrimer-F1	AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT
		NIID-swH1 TMPrimer-R1	TGTTTCCACAATGTARGACCAT
		NIID-swH1 Probe2	5'-Cy5-CAGCCAGCAATRTTCATTTACC-MGB-3'
A(H1N1)	HA	NIID-H1 TMPrimer-F1	CCCAGGGYATTTCCGCGACTATGAG
		NIID-H1 TMPrimer-R1	CATGATGCTGAYACTCCGGTTACG
		NIID-H1 Probe1	5'-Yakima yellow-TCTCAAAYGAAGATACTGAACT- MGB-3'
B(Victoria)	HA	BHA-188F*	AGACCAGAGGGAAACTATGCCC
		BHA-270R**	TCCGGATGTAACAGGTCTGACTT
		Probe-VIC2	5' ROX-CAGACCAAATGCACGGGAAHATACC-3'-BHQ

B(Yamagata)	HA	BHA-188F*	AGACCAGAGGGAAACTATGCC
		BHA-270R**	TCCGGATGTAACAGGTCTGACTT
		Probe-YAM2	5' Cy5-CAGRCCAATGTGTGTGGGGAYCACACC-3'-BHQ

Tabla 2 Cebadores y sondas utilizadas en el tipado

* Schweiger et al. 2000 (Journal of Clinical Microbiology 38(4) 1552–1558)

** Watzinger et al. 2004 (Journal of Clinical Microbiology 42(11) 5189–5198)

RT-PCR en dos pasos

Para secuenciar las muestras antes deben transcribirse de ARN a ADNc. Esto se consigue mediante una RT-PCR realizada siguiendo los protocolos de la OMS (WHO, 2012). El primero de los pasos consiste en una retrotranscripción en la que se utiliza el cebador universal Uni12W para amplificar las regiones conservadas que flanquean cada uno de los 8 segmentos del genoma de gripe. Aunque la bibliografía indica que el cebador Uni12W es específico de gripe A y para gripe B se debería utilizar Buni11W, se utiliza Uni12W independientemente del tipo de gripe ya que no se observan distinciones en el éxito de la amplificación (Tabla 3).

Cebador	Secuencia
Uni12W	AGCRAAAGCAGG
Buni11W	AGCAGAAGCGS

Tabla 3 Cebadores utilizados en el 1r paso (retrotranscripción) de la RT-PCR a dos pasos

En el segundo paso se utilizan cebadores específicos de cada tipo de gripe para amplificar dos regiones del gen HA, una región cercana a 3' y otra a 5'. La tabla 4 incluye los cebadores utilizados.

Tipo/Subtipo	Fragmento Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado (bp)
A/H3N2	HA-5'(H3)	H3A1F6 H3A1R1	AAGCAGGGGATAATTCTATTAACC GTCTATCATTCCCTCCAACCATT	1127
	HA-3'(H3)	H3A1F3 HARUc	TGCATCACTCCAAATGGAAGCATT ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	863
A/H1N1pmd09	HA-5'(H1)	H1F1 H1R1264	AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAGC CCTACTGCTGTGAACTGTGTATTTC	1264
	HA-3'(H1)	H1F848 HARUc	GCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTG ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	945
A/H1N1	HA-5'(H1)	THAF2 SPHAR11	GCAGGGGAAAATAAAAAACAACC TATTTTGGGCACTCTCTATTG	990
	HA-3'(H1)	H1HAF552 HARUc	TACCCAAACCTGAGCAAGTCCTAT ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	1239
Gripe B (Yam y Vic)	HA-5'	BHAF1u BHAR1341	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATTTCTAATATC TTCGTTGTGGAGTTCATCCAT	1361
	HA-3'	BHAF458 BHA2R1	AGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTA GTAATGGTAACAAGCAAACAAGCA	1391

Tabla 4 Cebadores utilizados en el 2o paso (amplificación de HA) de la RT-PCR a dos pasos

Electroforesis

Los amplificados se comprobaron mediante una electroforesis en gel de agarosa. El gel utilizado se preparó a partir de 120 ml de agarosa 0,8% y 3,5 µl Gelred de Biotium (agente intercalante fluorescente). En cada ensayo se utilizaron 5 µl de producto de PCR con 2 µl de tampón de carga. Como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler DNA Ladder 1kb (Fermentas, Lituania). Los geles se visualizaron en una transiluminador de luz ultravioleta.

Las muestras con ausencia de bandas o con bandas tenues se registraron como errores y se repitió la RT-PCR en dos pasos. Lo mismo con aquellas muestras que presentaban múltiples bandas, posiblemente fruto de un error metodológico o de una muestra inadecuada.

Purificación de los amplificados

Se seleccionaron aquellas muestras que presentaban bandas visibles y se purificaron por filtración en membrana en placas de 96 pocillos mediante centrifugación. Esto se realiza para eliminar del producto de PCR impurezas como dímeros de cebador o los reactivos utilizados en la amplificación del ADN.

Una vez comprobada la concentración y pureza de las muestras utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000, se prepara una placa de 96 pozos en la que se secuenciarán 12 muestras, para cada una se utilizan 8 cebadores específicos de distintas zonas del gen HA. Posteriormente los fragmentos secuenciados se integrarán en una única secuencia consenso ya que hay segmentos del ADN secuenciado que se solapan.

Las placas se envían al departamento de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, España, donde secuencian los fragmentos mediante el método Sanger con el kit de secuenciación de BigDye Direct Cycle en un secuenciador de ADN ABI 3730xl (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, EE. UU.)

Alineamiento de secuencias

Los 8 fragmentos secuenciados mediante secuenciación Sanger en SCSIE de cada muestra se ensamblaron utilizando el programa GAP. Tomando como secuencia de referencia la secuencia de la vacuna se estableció una secuencia consenso de cada muestra. Estas secuencias se integraron y alinearon en una misma tabla utilizando el software Bioedit versión 7.2.5. Las secuencias de nucleótidos se tradujeron a aminoácidos y se eliminaron los péptidos señal (15 primeros residuos)

Utilizando el programa MEGA 6.0 se abrió el archivo FASTA que contenía la tabla de secuencias y se seleccionaron únicamente aquellas posiciones de aminoácidos que varían respecto la secuencia de referencia.

Resultados y discusión

Análisis de mutaciones

Las tablas 10-14 (anexo) recogen las substituciones de aminoácidos que presenta cada muestra respecto a la cepa utilizada en la vacuna (A_Hong_Kong_4801_2014 para A/H3N2; A_Michigan_45_2015 para

A/H1N1pdm09 y B_Phuket_3073_2013 para B/Yam), el porcentaje de similitud respecto a la secuencia de la vacuna y las posiciones de residuos que se corresponden con un epítipo (columnas marcadas con color)

La secuencia de referencia (B/Brisbane/60/2008) con la que se compara la única muestra de gripe B/Vic coincide con la que la OMS recomienda que se incluya en vacunas cuadrivalentes en el hemisferio sud para las temporadas de vacunación 2017- 2018. (World Health Organization (WHO), 2017)

De las 105 muestras de gripe analizadas y secuenciadas, 58 se corresponden con A/H3N2, 14 con A/H1N1pdm09, 32 B/Yam y 1 B/Vic.

A/H3N2 presenta 54 mutaciones distintas (27 en sitios antigénicos y 25 en sitios no antigénicos), A/H1N1pdm09 14 mutaciones distintas(3 en sitios antigénicos y 11 en sitios no antigénicos), B/Yam 24 mutaciones distintas (4 en sitios antigénicos y 20 en sitios no antigénicos) y 1 B/Vic mutaciones distintas (0 en sitios antigénicos y 1 en sitios no antigénicos).

A/H3N2

De las 105 muestras secuenciadas, 58 se corresponden con A/ H3N3. Estas se pueden clasificar en 2 grupos en función de las mutaciones que comparten las muestras. El grupo 1 comparte mutaciones en las posiciones E62G (n=20), K92R (n=23), N121K (n=23), T128A (n=16), T135 (n=22), R142G (n=22), K171N (n=23), H311Q (n=23) todas ellas formando parte de algún epítipo y I406V (n=23) y G484 (n=23) que no forman parte de ningún epítipo y se ubican en HA2. El grupo 2 posee mutaciones comunes en las posiciones T131K (n=34), R142K (n=35) y R161Q (n=35).

Se observa una heterogenicidad de aminoácidos significativa en los sitios antigénicos. Se recogen 27 mutaciones en 24 posiciones distintas, lo que sugiere una elevada evolución. Además de las mutaciones que caracterizan los grupos o linajes, se observan modificaciones puntuales en E62K (n=2), Q80K (n=3), L86F (n=1), Y94H (n=4), N96S (n=1), N122D (n=3), T135N (n=1), S137A

(n=1), S144R (n=11), N158K (n=1), G186S (n=1), L194R (n=1), A212T (n=3), A212S (n=1), S219F (n=1), K264I (n=1) y S265G (n=3).

La existencia de dos grupos con mutaciones comunes apunta a la diferenciación de dos clados independientes. El grupo 2 se corresponde con el Clado 3c2.Ab2 identificado por la OMS, ya que comparte las 3 mutaciones documentadas (131K, 142K y 161Q). Mientras tanto, la presencia de mutaciones en las posiciones N171K y N121K coinciden con la evolución que siguió hasta 2016 el Clado 3c2.A1 identificado por la OMS, y E62G y R142G hasta el año 2017. A partir de este punto las muestras se diversifican en dos subclados. Las muestras comparten mutaciones que las posicionarían tanto en el subclado A1a (135K) como A1b (92R y 311Q) (Bedford & Neher, 2017)

Para abreviar se les nombrará como clados A2, A1a y A1b.

A fechas de febrero de 2018 habían 4 clados de A/H3N2 en circulación. A2 y A1b con una elevada incidencia en la población, llegando a representar el 40% y el 30% de los casos de de gripe A/H3N2 a nivel mundial. Se estima que el clado A3 tiene una frecuencia global del 25% y el clado A4 menor al 5%. En Europa, la frecuencia en la población de A2 asciende al 60% y A1b al 40%.

De las 58 muestras analizadas en la Comunitat Valenciana, el 62% corresponden al clado A2 y aproximadamente el 38% al A1b.

A/H1N1pdm09

Las 14 muestras de A/H1N1pdm09 comparten 2 mutaciones en sitios antigénicos S74R (n=14) y S164T (n=14) y 2 en sitios no antigénicos R223Q (n=14) y I295V (n=13). En total, las muestras presentan mutaciones en 14 posiciones diferentes, 3 de ellas en sitios antigénicos S74R (n=14), S164T (n=14) y E235D (n=1).

A diferencia de A/H3N2, actualmente solo hay un clado de A/H1N1pdm09 en circulación. Este se caracteriza por poseer los residuos S74R, S164T y I295V, los cuales coinciden con las muestras secuenciadas. A este clado se le nombró 6b.1. Por otra parte, el 50% de los casos estudiados presentan una mutación en la posición T120A (n=7) que coincide con los datos reportados por (Bedford

& Neher, 2017). La frecuencia de esta mutación había aumentado al 40% a fechas de febrero del 2018. Nuestra muestra nº14 posee las mutaciones compartidas con el clado 6.1 (S74R, S164T, S223Q y I295V) y 4 mutaciones características (S183P, E235D, N260D y V510A), una de ellas en un epítopo (E235D). Anteriormente, la sustitución S183P había circulado independiente del clado 6b.1, pero recientemente ha resurgido dentro del clado S164T, predominante en EEUU.

B/Yam

Las 32 muestras de B/Yam analizadas presentan 24 mutaciones distintas. Las muestras comparten 2 mutaciones en sitios no antigénicos: L172Q (n=30) y M251V (n=32). Se observan 4 mutaciones aisladas en sitios antigénicos: M71T (n=1), A79P (n=1), G141R (n=1) y D229N (n=1).

En muestras de B/Yam se observa una baja variación del gen HA. Las cepas en circulación se caracterizan por la mutación M251V.

B/Vic

La única muestra de B/Victoria obtenida presenta 1 mutación en sitios antigénicos (I117V(n=1)) y otras 3 en sitios no antigénicos (N129G(n=1), I178V(n=1) y S195T(n=1)), además de 2 deleciones (N162del K163del; tabla 13, Anexos), coincidente con los virus circulantes en otros países. Aunque en su momento se identificó otra muestra como B/Vic, esta última no se ha incluido en el trabajo ya que no se secuenció correctamente.

Estructura tridimensional

En las figuras 1-4 se puede observar las posiciones que ocupan las mutaciones en la estructura tridimensional de la hemaglutinina (HA) de los distintos tipos de virus de la gripe estudiados. Las mutaciones en sitios antigénicos están coloreadas en función del epítopo en el que se encuentran (Tabla 5) y sus posiciones están escritas en color rojo. Las mutaciones en sitios no antigénicos están coloreadas de blanco y escritas en negro para distinguirlas del resto.

Las mutaciones detectadas en los sitios antigénicos se recogen en la tabla 5. En las tablas, cada epítipo está marcado con un color determinado que se corresponde con el utilizado para localizarlo en la estructura tridimensional (Figuras 1-4).

A/H3N2		A/H1N1pdm09	
Sitio antigénico	Residuos modificados	Sitio antigénico	Residuos modificados
A	122, 131, 135, 137, 142, 144	Sa	164
B	128, 158, 186, 194	Sb	
C	331	Ca1	235
D	96, 121, 171, 212, 219	Ca2	
E	62, 80, 86, 92, 94, 261, 264, 265	Cb	74

B/Yam		B/Vic	
Sitio antigénico	Residuos modificados	Sitio antigénico	Residuos modificados
Lazo 120	71, 79	Lazo 120	I117V
Lazo 150	141	Lazo 150	
Lazo 160		Lazo 160	K162Del N163Del
Hélice 190		Hélice 190	
Región 230	229	Región 230	

Tabla 5: Mapa de mutaciones en sitios antigénicos de A/H3N2, A/H1N1pdm09, B/Yam y B/vic

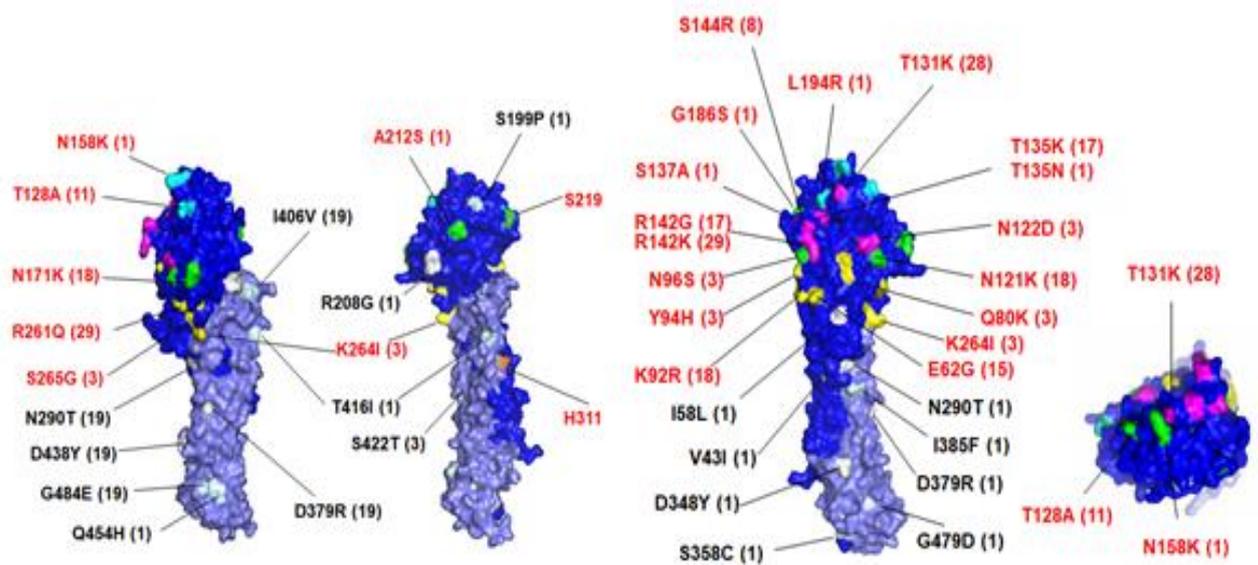


Figura 1 Caracterización de las mutaciones en sitios antigénicos en el monómero de HA de A/H3N2

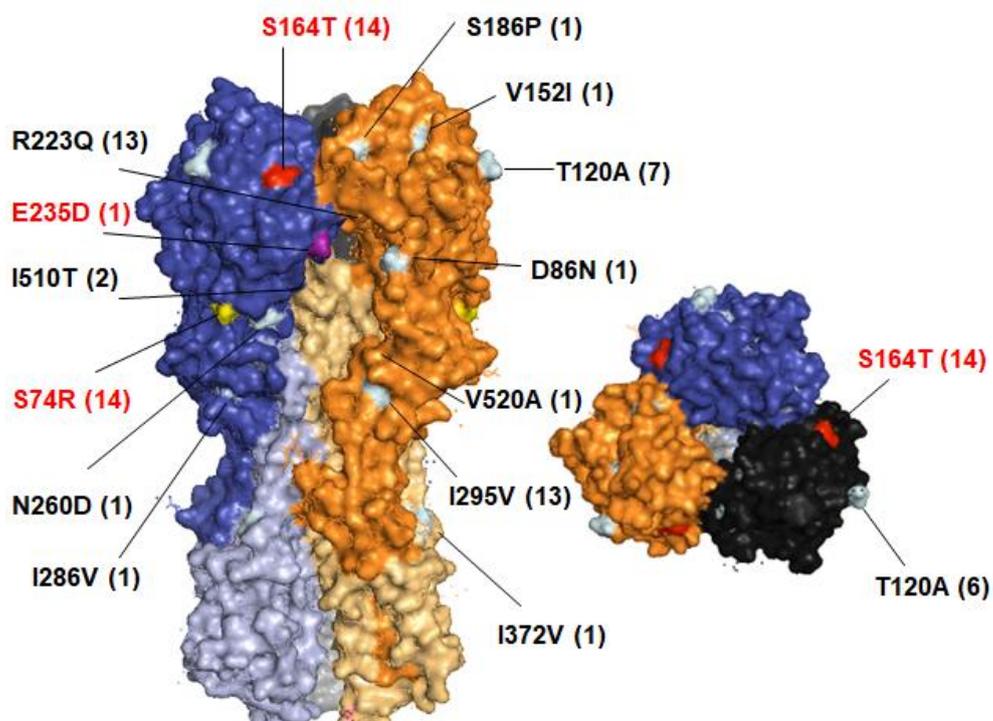


Figura 2 Caracterización de las mutaciones en sitios antigénicos en el trímero de HA de A/H1N1pdm09

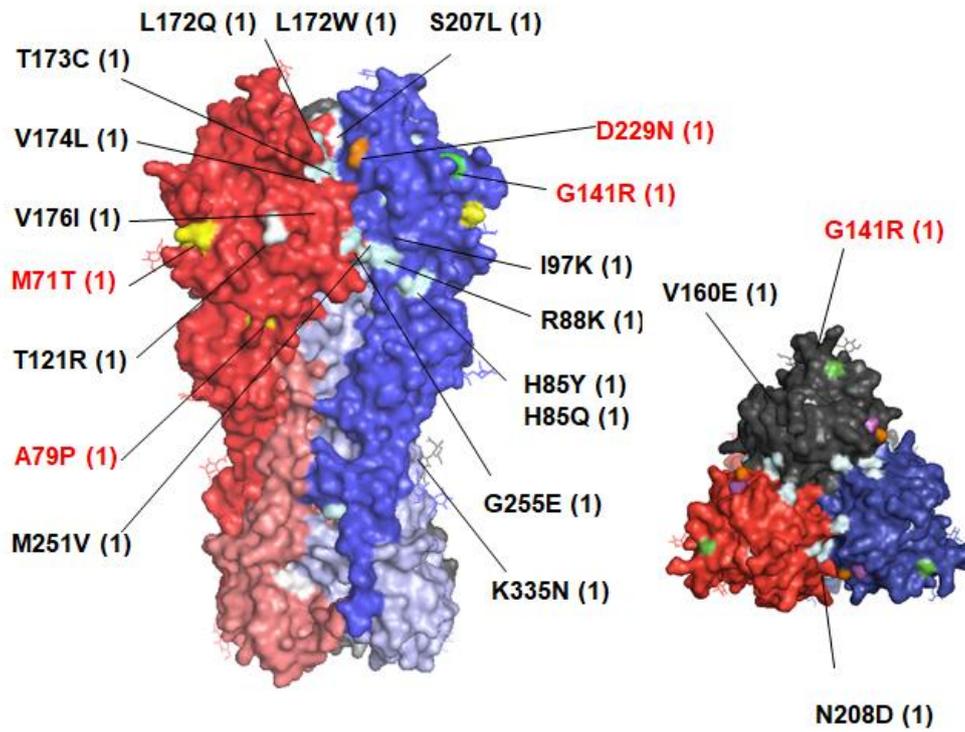


Figura 3 Caracterización de las mutaciones en sitios antigénicos en el trómero de HA de B/Yam

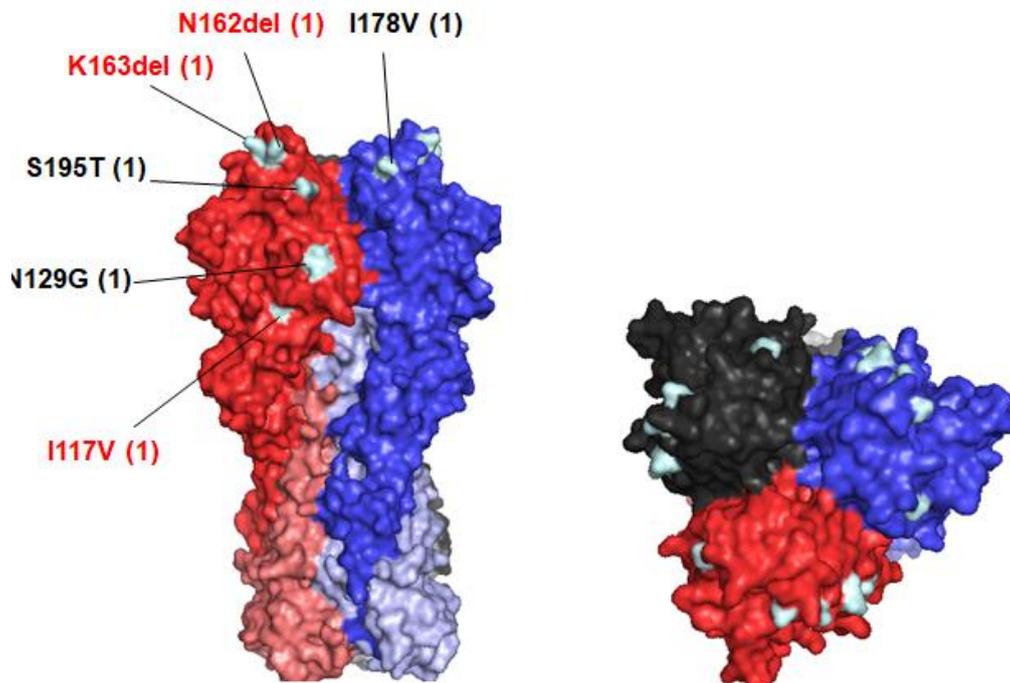


Figura 4 Caracterización de las mutaciones en sitios antigénicos en el trómero de HA de B/Vic

Glicosilación

El análisis de la secuencia de aminoácidos se puede efectuar como método predictivo para conocer los sitios potenciales de glicosilación. Localizando la secuencia de glicosilación ligada a N(Asn-X-Ser/Thr-Y) y sus modificaciones es posible predecir la probabilidad de la glicosilación.

Los sitios de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr-Y) de las muestras incluidas en el estudio se predijeron utilizando el algoritmo del portal web NetNGlyc 1.0 server <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> . El programa genera por cada muestra una tabla en la que indica el potencial de glicosilación para cada sitio de glicosilación. Si el potencial sobrepasa el umbral de 0,5 se considera el sitio como glicosilado y si es menor a 0,5 como no glicosilado. La puntuación 'potencial' se establece a partir promedio de nueve algoritmos (ECHO, GLYCOME, AWK, PERL, swiss-prot, etc)

El resultado de la glicosilación se marcará con los signos “-,+, ++, +++, +++++”. Si el potencial de glicosilación es $<0,5$ se marcará con “-” indicando que el sitio no se glicosilará. Si el umbral es $>0,5$ se marcará como positivo.

Si el potencial de glicosilación $<0,5$, el resultado es “-”

Si el potencial de glicosilación $>0,5$, el resultado es “+”

Si el potencial de glicosilación $>0,5$ y coinciden 9/9 portales, el resultado es “++”

Si el potencial de glicosilación $>0,75$ y coinciden 9/9 portales, el resultado es “+++”

Si el potencial de glicosilación $>0,90$ y coinciden 9/9 portales, el resultado es “++++”

A/H3N2

La tabla 6 recoge los cambios en la glucosilación, tanto reducciones (483 NGTY) como la pérdida de glicosilación (122 NESF, 126 NWTG, 133 NGKS y 158 KYTY). Las pérdidas de glicosilación se asocian con la mutación del residuo N122K y N158K, que al no presentar residuo Asparagina no se realiza la glicosilación; y las mutaciones 126 NWTG y 133 NGKS que no presentan ni una Treonina ni Serina en la tercera posición del motivo (Asn-X-Ser/Thr-Y). Por otra parte, se observa una reducción del potencial de glucosilación en el motivo localizado en la posición 483 debido a la mutación G484E, localizado en la segunda posición del motivo.

Subtipo	Cola					Cabeza								Cola	
	Posición motivo	8	22	38	45	63	122	126	133	135	158	165	246	285	483
	Secuencia vacuna	NSTA	NGTI	NATE	NSSI	NCTL	NESF	NWTG	NGTS	TSSA	NYTY	NVTM	NSTG	NGSI	NGTY
		+++	++	+	+	++	-	+	++	No Glyc	+	+++	+	++	+
A/H3N2	16 Muestras							NWAG	NGKS						NETY
								No glyc	No Glyc						-
	1 Muestras						DESF	NWTG	NGKS		KYTY				NETY
							No Glyc	-	No Glyc		No Glyc				-
	2 Muestras						DESF	NWTG	NGKS						NETY
							No Glyc	-	No Glyc						-
	3 Muestras								NGKS						NETY
									No Glyc						-
	1 Muestras								NGKS	NGNS					NETY
									No Glyc	++					-
Recuento	0	0	0	0	0	3	16	22	1	1				23	

Tabla 6 Potencial de glucosilación en virus A/H3N2

Únicamente se observan estas alteraciones en el patrón de glucosilación en muestras pertenecientes al clado A1. Por ejemplo, la muestra N° 1 presenta una mutación T135N que altera el motivo en la posición 133 y crea uno nuevo en la posición 135 ya que cumple el patrón N-X-S/T-Y.

Por otra parte, el clado A2 no posee ninguna mutación que altere el patrón de glucosilaciones, y se ha observado que es idéntico al de la cepa de la vacuna.

A/H1N1pdm09

Las 12 muestras de A/H1N1pdm09 presentan una mutación (T162S) que substituye el residuo Ser por un residuo Thr en la tercera posición del motivo (Asn-X-Ser/Thr-Y). Esta modificación que aumenta el potencial de glucosilación de 162 Asn. (Tabla 7)

Subtipo	Cola			Cabeza		Cola				
	Posición motivo	10	11	23	87	162	276	287	481	540
	Secuencia vacuna	NNST	NSTD	NVTV	NGTC	NQTY	NTTC	NTSL	NGTY	NGSL
		-	+++	+++	+	+	-	++	+	++
A/H1N1pdm09	12 muestras				NQSY					
					++					
	Recuento variaciones	0	0	0	0	12	0	0	0	0

Tabla 7 Potencial de glucosilación A/H1N1pdm09

B/Yam

De las 34 muestras de B/Yam analizadas, ninguna de ellas presenta una mutación localizada en un motivo de glucosilación, por lo que no se observa ninguna variedad en el patrón de glucosilación o el potencial de las glucosilaciones (Tabla 8).

Subtipo	Cola			Cabeza		Cola						
	Posición motivo	25	59	145	162	206	303	332	491	517	530	562
	Secuencia vacuna	NVTG	NCTD	NATS	NATN	NKTQ	NKSK	NGTK	NQTC	NITA	NHTI	NVSC
		+++	+++	+	+	++	+++	+++	-	+	+	+
B/Yam	0 muestras alteradas											
	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 8: Potencial de glucosilación B/Yam

B/Vic

En la única muestra de gripe B/Vic, la mutación S195N crea un motivo de glucosilación nuevo (197* NETQ) (Tabla 9)

Subtipo	Cola		Cabeza				Cola					
	Posición motivo	25	59	145	166	195	233*	304*	333*	492*	518*	531*
Secuencia vacuna	NVTG	NCTD	NITN	NKTA	SETQ	NQTE	NKSK	NGTK	NQTC	NITA	NHTI	NVSC
	+++	+++	+	+	No Glyc	+	+++	+++	-	+	+	+
B/Vic	1 muestra		NETQ									
			+									
Recuento variación	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 9: Potencial de glicosilación B/Vic

*Debido a las 2 deleciones que presenta esta muestra, la posición de los residuos de la muestra están desplazados a partir del residuo 163. Cada posición de la secuencia de la muestra se corresponde con dos más de la vacuna.

Discusión de los resultados

A/H1N1

Aunque las autoridades sanitarias temen la aparición, o liberación, de una nueva cepa de gripe A/H1N1 en este estudio no se ha identificado ninguna muestra perteneciente a este grupo.

A/H3N2

La elevada variación de aminoácidos localizados en sitios antigénicos y la presencia de dos clados en gripe A/H3N2 sugiere una elevada evolución de este tipo de gripe. Filogenéticamente, la cepa incluida en la vacuna actual A/Hong Kong/4801/2014 se asemeja al clado A2, mientras que el clado A1 varía respecto a la secuencia de A/Hong Kong/4801/2014 en 10 residuos, 7 de ellos en sitios antigénicos. Estos resultados explican porqué, sin ir más lejos, la efectividad de la vacuna en casos de gripe A/H3N2 durante la temporada

2017-2018 ha sido del 25%, siendo la eficacia conjunta para gripe A y B del 36%. Los resultados para A/H3N2 en el grupo de riesgo de personas con más de 65 años ha sido del 17%.

A mediados de la temporada, se ha sugerido que se debían haber utilizado componentes de la cepa A/Bolzano/7/2016. Esta cepa pertenece al clado A1, por lo que induce la producción de anticuerpos contra virus del clado A1, frecuentes en la temporada 2017-18.

Finalmente, la OMS recomendó en marzo de 2018 la sustitución de la cepa vacuna A/Hong Kong/4801/2014 (A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016, clado A2) por otra parecida a A/Bolzano/7/2016 (clado A1). Si, a la hora de tomar la decisión –finales de febrero de 2018- tenemos en cuenta las dos vertientes evolutivas, era difícil predecir cual de los clados tendrá una mayor incidencia en la población la temporada 2018-2019, pero debido al tiempo necesario para la producción de la nueva vacuna, se ha escogido la opción más plausible. (World Health Organization (WHO), 2018)

H1n1pdm09

A diferencia de A/H3N2, la cepa de la vacuna de A/H1N1pdm09 se actualizó en el año 2016 a A_Michigan_45_2015 para que coincidiese con el clade 6b.1. Ninguna de las recientes mutaciones de A/H1N1pdm09 tiene un impacto remarcable en ensayos antigénicos, por lo que la vacuna para A/H1N1pdm09 estaría actualizada. Sin embargo, las mutaciones recurrentes sugieren el posible inicio de la diferenciación en distintos clados.

B/Yam

Las muestras de B/Yam comparten 2 mutaciones respecto a la secuencia incluida en la vacuna, aunque ninguna en sitios antigénicos. Tampoco ve alterado su patrón de glucosilación. Por otra parte, se han informado a la OMS de un elevado número de mutaciones en el gen NA que ha conducido a la diferenciación de distintos clados.

Al no haber secuenciado NA no es posible determinar la variabilidad de nuestros virus en circulación. De haber sabido anteriormente esto se hubiese

sugerido al laboratorio incluir ensayos enfocados en NA ya que el 30% de las muestras recogidas pertenecen a este linaje.

La OMS, sin embargo, sigue recomendando la cepa del 2013 B/Phuket/3073/2013 para la nueva campaña 2018-19.

B/Vic

El bajo número de muestras identificadas (n=1) indica una baja incidencia en nuestra población. Asimismo, esta escasez limita el estudio de su evolución. Es destacable que se hayan identificado 2 deleciones simultaneas (N162Del y K163Del), las cuales se encuentran en el epítipo "giro 160", que induce la aparición de un nuevo motivo de potencial glucosilación. Observando únicamente la secuencia es imposible predecir como estas deleciones modifican la estructura terciaria de la glucoproteína, más allá de reducir el reconocimiento por los anticuerpos, aunque teniendo en cuenta la importancia de HA podemos anticipar que conserva su función. Con solo una muestra no podemos realizar observaciones significativas. La OMS recomendado, sin embargo, sustituir cepa B/vic de la vacuna con B/Colorado/06/2017, la cual presenta estas dos características deleciones.

Conclusiones

Este trabajo nos ha permitido caracterizar las muestras de gripe A/H1N1pdm09, A/H3N2, B/Yam y B/Vic, e identificar las mutaciones en HA que acumulan los distintos clados respecto a la secuencia de la cepa incluida en la vacuna, tanto en epítipos como en sitios no antigénicos, y detectar variaciones en el patrón de glucosilación.

Comparando los resultados obtenidos, estos coinciden con los documentados por GHISN y por la OMS, llegando a las mismas conclusiones:

- Para virus A/H3N2, la acumulación de mutaciones en los epítipos en el clado A2 y en mayor medida en el A1 hace necesario actualizar la cepa de la vacuna (por ejemplo con una parecida a A/Bolzano/7/2016)

- La emergencia de un clado de virus en B/Vic con 2 deleciones en residuos localizados en el epítipo “giro 160” sugiere la substitución de la cepa actual por una con las dos deleciones (por ejemplo, con una parecida a B/Colorado/06/2017).
- La baja variabilidad de A/H1N1pdm09 y B/Yam y la similitud con las cepas incluida en la vacuna actual justifica que no se actualicen estos componentes de la vacuna.

Autoevaluación

Debo reconocer que al inicio de este trabajo, tanto mi conocimiento de virus como mis habilidades de procesado de datos no superaba el nivel que tendría cualquier biotecnólogo en su primer año de carrera. Lejos de suponer un obstáculo, esta falta de saber ha hecho más grande la franja de aprendizaje, permitiéndome disfrutar el goteo de conocimientos que emana del laboratorio, además de sentir el paciente que hay detrás de cada muestra. Realizar este trabajo me ha brindado la oportunidad de contemplar la investigación de primera mano, de interaccionar con profesionales del sector y de formar por primera vez parte de un equipo cuyo trabajo tiene una clara repercusión en la sociedad.

Referencias

- Abe, Y., Takashita, E., Sugawara, K., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., & Hongo, S. (2004). Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *Journal of Virology*, 78(18), 9605–9611. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.9605-9611.2004>
- B.L., R. (2003). Epidemiology and control of influenza. *National Medical Journal of India*. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&N EWS=N&AN=2003318437>
- Basak, S., Pritchard, D. G., Bhowm, a S., & Compans, R. W. (1981). Glycosylation sites of influenza viral glycoproteins: characterization of tryptic glycopeptides from the A/USSR(H1N1) hemagglutinin glycoprotein. *Journal of Virology*, 37(2), 549–558. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=171041&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Basak, S., Tomana, M., & Compans, R. W. (1985). Sialic acid is incorporated into influenza hemagglutinin glycoproteins in the absence of viral neuraminidase. *Virus Research*, 2(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(85\)90060-7](https://doi.org/10.1016/0168-1702(85)90060-7)
- Bedford, T., & Neher, R. (2017). Seasonal influenza circulation patterns and projections for Sep 2017 to Sep 2018. *bioRxiv*, 191676. <https://doi.org/10.1101/191676>
- Bedford, T., Riley, S., Barr, I. G., Broor, S., Chadha, M., Cox, N. J., ... Russell, C. A. (2015). Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature*, 523(7559), 217–220. <https://doi.org/10.1038/nature14460>

- Castilla, J., Navascués, A., Casado, I., Díaz-González, J., Pérez-García, A., Fernandino, L., ... Castilla, J. (2017). Combined effectiveness of prior and current season influenza vaccination in northern Spain: 2016/17 mid-season analysis. *Eurosurveillance*, 22(7). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.7.30465>
- Chan, M., & World Health Organization. (2009). World now at the start of 2009 influenza pandemic. *Press Release*. Retrieved from http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html
- Compans, R. W., & Pinter, A. (1975). Incorporation of sulfate into influenza virus glycoproteins. *Virology*, 66(1), 151–160. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90186-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90186-5)
- Costantino, C., & Vitale, F. (2016). Influenza vaccination in high-risk groups: A revision of existing guidelines and rationale for an evidence-based preventive strategy. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(1), E13–E18.
- Gasparini, R., Lucioni, C., Lai, P., Maggioni, P., Sticchi, L., Durando, P., ... Crovari, P. (2002). Cost-benefit evaluation of influenza vaccination in the elderly in the Italian region of Liguria. *Vaccine*, 20(SUPPL. 5). [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00507-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00507-8)
- Grupo de Vigilancia de Gripe. (2017). *Informe de Vigilancia de la Gripe en España Temporada 2016-2017*. Instituto de Salud Carlos III. Retrieved from http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-gripe/fd-informes-semanales-vigilancia-gripe/pdfs_2016_2017/Informe_Vigilancia_GRIPE_2016-2017_v.27septiembre2017.pdf
- He, J., Bose, M. E., Beck, E. T., Fan, J., Tiwari, S., Metallo, J., ... Henrickson, K. J. (2009). Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1

- (human), N1 (animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 O. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 2772–2778. <https://doi.org/10.1128/JCM.00998-09>
- Kaverin, N. V., & Klenk, H. D. (1999). Strain-specific differences in the effect of influenza A virus neuraminidase on vector-expressed hemagglutinin. *Archives of Virology*, 144(4), 781–786. <https://doi.org/10.1007/s007050050543>
- Koel, B. F., Burke, D. F., Bestebroer, T. M., Van Der Vliet, S., Zondag, G. C. M., Vervaet, G., ... Smith, D. J. (2013). Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science*, 342(6161), 976–979. <https://doi.org/10.1126/science.1244730>
- Kornfeld, R. (1985). Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 631–664. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.54.1.631>
- Lewis, N. S., Daly, J. M., Russell, C. A., Horton, D. L., Skepner, E., Bryant, N. A., ... Smith, D. J. (2011). Antigenic and Genetic Evolution of Equine Influenza A (H3N8) Virus from 1968 to 2007. *Journal of Virology*, 85(23), 12742–12749. <https://doi.org/10.1128/JVI.05319-11>
- Linderman, S. L., Chambers, B. S., Zost, S. J., Parkhouse, K., Li, Y., Herrmann, C., ... Hensley, S. E. (2014). Potential antigenic explanation for atypical H1N1 infections among middle-aged adults during the 2013-2014 influenza season. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(44), 15798–15803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409171111>
- Mcanerney, J. M., Treurnicht, F., Walaza, S., Cohen, A. L., Tempia, S., Mtshali, S., ... Cohen, C. (2015). Evaluation of influenza vaccine effectiveness and description of circulating strains in outpatient settings in South Africa, 2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 9(4), 209–215. <https://doi.org/10.1111/irv.12314>
- Medina, R. A., Stertz, S., Manicassamy, B., Zimmermann, P., Sun, X., Albrecht,

- R. A., ... García-Sastre, A. (2013). Glycosylations in the globular head of the hemagglutinin protein modulate the virulence and antigenic properties of the H1N1 influenza viruses. *Science Translational Medicine*, 5(187). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005996>
- Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L., & Shakin-Eshleman, S. H. (1998). The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry*, 37(19), 6833–6837. <https://doi.org/10.1021/bi972217k>
- Petrova, V. N., & Russell, C. A. (2018). The evolution of seasonal influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>
- Roberts, P. C., Garten, W., & Klenk, H. D. (1993). Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *Journal of Virology*, 67(6), 3048–3060. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497042> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC237641>
- Russell, C. A., Kasson, P. M., Donis, R. O., Riley, S., Dunbar, J., Rambaut, A., ... Bloom, J. D. (2014). Improving pandemic influenza risk assessment. *eLife*, 3, e03883. <https://doi.org/10.7554/eLife.03883>
- Simonsen, L., Clarke, M. J., Schonberger, L. B., Arden, N. H., Cox, N. J., & Fukuda, K. (1998). Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(1), 53–60. <https://doi.org/10.1086/515616>
- Simonsen, L., Reichert, T. A., Viboud, C., Blackwelder, W. C., Taylor, R. J., & Miller, M. A. (2005). Impact of influenza vaccination on seasonal mortality in the US elderly population. *Archives of Internal Medicine*, 165(3), 265–272. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.3.265>
- Skehel, J. J., Stevens, D. J., Daniels, R. S., Douglas, A. R., Knossow, M., Wilson, I. A., & Wiley, D. C. (1984). A carbohydrate side chain on

hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Cell*, 81(March), 1779–1783.

<https://doi.org/10.1073/pnas.81.6.1779>

Smith, D. J. (2004). Mapping the Antigenic and Genetic. *Science*, 305(July), 371–376. <https://doi.org/10.1126/science.1097211>

Smith, D. J., Lapedes, A. S., De Jong, J. C., Bestebroer, T. M., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2004). Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 305(5682), 371–376. <https://doi.org/10.1126/science.1097211>

SRIWILAIJAROEN, N., & SUZUKI, Y. (2012). Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 88(6), 226–249.

<https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>

Stöhr, K. (2002). Influenza - WHO cares. *Lancet Infectious Diseases*.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00366-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00366-3)

Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., & Veit, M. (2017). Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216>

Sun, S., Wang, Q., Zhao, F., Chen, W., & Li, Z. (2011). Glycosylation site alteration in the evolution of influenza a (H1N1) viruses. *PLoS ONE*, 6(7).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022844>

Tate, M. D., Job, E. R., Deng, Y. M., Gunalan, V., Maurer-Stroh, S., & Reading, P. C. (2014). Playing hide and seek: How glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection.

Viruses. <https://doi.org/10.3390/v6031294>

Ward, C. W., & Dopheide, T. a. (1981). Amino acid sequence and oligosaccharide distribution of the haemagglutinin from an early Hong Kong influenza virus variant A/Aichi/2/68 (X-31). *The Biochemical Journal*, 193(3), 953–962. <https://doi.org/10.1042/bj1930953>

- Wei, C. J., Boyington, J. C., Dai, K., Houser, K. V., Pearce, M. B., Kong, W. P., ... Nabel, G. J. (2010). Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: Role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Science Translational Medicine*, 2(24).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000799>
- WHO. (2011). WHO information for molecular diagnosis of influenza virus in humans - update. *Who*, 1–38.
- WHO. (2012). Vaccines against influenza WHO position paper – November 2012. *Weekly Epidemiological Record*, 47(87), 461–476.
<https://doi.org/10.1371/jour>
- WHO. (2016). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016–2017 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec*, 91(10), 121–132. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-2-15.Voir>
- World Health Organization (WHO). (2017). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018 southern hemisphere influenza season. *The Weekly Epidemiological Record*, 92(42), 625–633.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.013>.
- World Health Organization (WHO). (2018). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018–2019 northern hemisphere influenza season February. *Weekly Epidemiological Record*, 93(12), 133–142.
- Zambon, M. C. (1999). Epidemiology and pathogenesis of influenza. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 44, pp. 3–9).
https://doi.org/10.1093/jac/44.suppl_2.3
- Zhang, L., Yang, P., Thompson, M. G., Pan, Y., Ma, C., Wu, S., ... Wang, Q. (2017). Influenza vaccine effectiveness in preventing influenza illness among children during school-based outbreaks in the 2014-2015 season in Beijing, China. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(3), e69–e75.
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001434>

III. Anexos

Tablas de mutaciones

sitio antigénico	E				E				D		A	B		A				B D		B		D				E				C			
posición de la	5	43	58	62	68	80	86	92	94	98	121	122	128	131	135	137	142	144	158	171	186	194	199	208	212	219	252	261	264	265	290	311	
Secuencia de	G	V	I	E	D	Q	L	K	Y	N	N	N	T	T	T	S	R	S	N	N	G	L	S	R	A	S	I	R	K	S	N	H	
muestra 1								R			K					N				K												Q	
muestra 2								R			K					K		G														Q	
muestra 3								R			K					K		G			K											Q	
muestra 4				G			K	R			K	D				K		G														Q	
muestra 5				G			K	R			K	D				K		G			K											Q	
muestra 6				G			K	R			K	D				K		G			K	K	S									Q	
muestra 7				G				R			K					K		G			K						V					Q	
muestra 8				G				R			K			A		K		G														Q	
muestra 9				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 10				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 11				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 12				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 13				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 14				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 15				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 16				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 17				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 18				G				R			K		A		K		G				K											Q	
muestra 19																	K												Q			Q	
muestra 20	I									H					K		K												Q			Q	
muestra 21										H					K		K												Q			Q	
muestra 22										H					K		K												Q			Q	
muestra 23										H					K		K												Q			Q	
muestra 24															K		K		R										Q		G	Q	
muestra 25															K		K		R										Q		G	Q	
muestra 26					N										K		A		K		R								Q		G	Q	
muestra 27															K		K		R										Q			Q	
muestra 28															K		K		R										Q			Q	
muestra 29															K		K		R										Q			Q	
muestra 30															K		K		R										Q			Q	
muestra 31															K		K		R										Q			Q	
muestra 32						F									K		K												Q			Q	
muestra 33															K		K												Q			Q	
muestra 34															K		K			K		R			S				Q			Q	
muestra 35															K		K												Q			Q	
muestra 36															K		K												Q			Q	
muestra 37															K		K												Q			Q	
muestra 38															K		K												Q			Q	
muestra 39											S				K		K								P				Q			Q	
muestra 40															K		K												Q			Q	
muestra 41															K		K												Q			Q	
muestra 42															K		K												Q			Q	
muestra 43															K		K												Q			Q	
muestra 44															K		K												Q			Q	
muestra 45															K		K												Q			Q	
muestra 46															K		K												Q			Q	
muestra 47															K		K												Q			Q	
muestra 48															K		K		R										Q			Q	
muestra 49				G				R			K		A		K		G				K								Q			Q	
muestra 50				K											K		K								T			Q				Q	
muestra 51			L	G				R			K		A		K		G				K							Q				Q	
muestra 52				G				R			K		A		K		G				K							Q		I		Q	
muestra 53															K		K		R									Q				Q	
muestra 54				G				R			K		A		K		G				K							Q				Q	
muestra 55				K											K		K								T			Q				Q	
muestra 56				G				R			K		A		K		G				K							Q				Q	
muestra 57															K		K								G	T		Q				Q	
muestra 58	E														K		R									F		Q				Q	
número de mut	1	1	1	22	1	3	1	23	3	1	23	3	16	34	23	1	57	11	1	23	1	1	1	1	1	4	1	1	35	1	3	1	23

Tabla 10.1 Tabla diferencias mutaciones A/H3N2

Epítipo																	Nº de aa diferentes epítipo	Nº de aa diferentes no epítipo	Nº de aa diferentes TOTAL			
Posición	348	357	358	379	385	406	416	422	440	454	455	470	479	484	525	543	545					
Referencia	D	N	S	D	I	I	T	S	T	Q	L	Y	G	G	F	N	R					
muestra 1						V								E						5	2	7
muestra 2						V								E						6	2	8
muestra 3						V								E						6	2	8
muestra 4						V		T						E						9	3	12
muestra 5						V		T						E						9	3	12
muestra 6						V		T						E						11	3	14
muestra 7						V								E		S				7	4	11
muestra 8						V								E						8	2	10
muestra 9						V								E						8	2	10
muestra 10						V								E						8	2	10
muestra 11						V								E						8	2	10
muestra 12						V								E						8	2	10
muestra 13						V								E						8	2	10
muestra 14						V								E						8	2	10
muestra 15						V								E						8	2	10
muestra 16						V								E						8	2	10
muestra 17						V								E						8	2	10
muestra 18						V								E						8	2	10
muestra 19																				2	0	2
muestra 20																				4	1	5
muestra 21																	K			4	1	5
muestra 22																				4	0	4
muestra 23																				4	0	4
muestra 24																				5	0	5
muestra 25																				5	0	5
muestra 26					F				I											6	3	9
muestra 27																				4	0	4
muestra 28																				4	0	4
muestra 29																				4	0	4
muestra 30																				4	0	4
muestra 31										H										4	1	5
muestra 32																				4	0	4
muestra 33										I										3	1	4
muestra 34			C							I										6	2	8
muestra 35									I											3	1	4
muestra 36																				3	0	3
muestra 37																				3	0	3
muestra 38						V								E						3	3	6
muestra 39																				4	0	4
muestra 40																				3	0	3
muestra 41																				3	0	3
muestra 42													D							3	1	4
muestra 43																				3	0	3
muestra 44																				3	0	3
muestra 45																				3	0	3
muestra 46																				3	0	3
muestra 47																				3	0	3
muestra 48																				4	0	4
muestra 49						V								E						8	2	10
muestra 50															S					5	1	6
muestra 51						V								E						9	2	11
muestra 52						V				M				E						8	3	11
muestra 53	Y	H	C			V														6	3	9
muestra 54				R		V								E						8	3	11
muestra 55																				5	0	5
muestra 56						V								E						8	2	10
muestra 57																				4	1	5
muestra 58										F										5	2	7
número de mutaciones	1	1	2	1	1	23	1	3	3	1	1	1	1	23	1	1	1					

Tabla 10.2 Tabla diferencias mutaciones A/H3N2

Epitopos	Cb		Sa		Ca1												Nº de aa diferentes epitopos	Nº de aa diferentes no epitopos	Nº de aa diferentes TOTAL
	74	86	120	152	164	164	183	223	235	260	260	286	295	372	510	520			
Referencia	S	D	T	V	S	S	S	R	E	N	I	I	I	I	I	V			
Muestra1	R		A		T		Q										2	2	4
Muestra 2	R		A		T		Q					V					2	3	5
Muestra3	R		A		T		Q					V					2	3	5
Muestra4	R		A		T		Q					V					2	3	5
Muestra5	R		A		T		Q					V					2	3	5
Muestra6	R		A		T		Q					V					2	3	5
Muestra7	R		A	I	T		Q					V					2	4	6
Muestra8	R				T		Q					V		T			2	3	5
Muestra9	R				T		Q					V					2	2	4
Muestra10	R	N			T		Q				V	V	V				2	5	7
Muestra11	R				T		Q					V					2	2	4
Muestra12	R				T		Q					V		T			2	3	5
Muestra13	R				T		Q					V					2	2	4
Muestra14	R				T	P	Q	D	D	D		V			A		3	5	8
Número	14	1	7	1	14	1	14	1	1	1	1	13	1	1	1	1			

Tabla 11 Tabla diferencias mutaciones A/H1N1pdm09

Epitopo	Giro		Giro 160		Giro 163		Giro 163		Giro 163		Nº de aa diferentes epitopos	Nº de aa diferentes TOTAL
	120	129	162	163	163	163	163	163	163			
posición	117	129	162	163	163	163	163	163	163	163	195	
referencia	I	N	k	N	I	S						
muestra 1Bvic	V	G	Del	Del	V	N					3	
número	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		6

Tabla 12 Tabla diferencias mutaciones V/Vic

Epi topo	120 loop				150 loop				Región 230												Nº de aa diferentes epitopo	Nº de aa diferentes no epitopo	Nº de aa diferentes TOTAL		
	71	79	85	88	97	121	141	160	172	173	174	176	207	208	229	251	255	335	391	407				418	419
Referencia	M	A	H	R	I	T	G	V	L	T	V	V	S	N	D	M	G	K	I	K	E	L			
muestra 1							E	W	C	L						V							0	5	5
muestra 2							Q	Q								V							0	2	2
muestra 3							Q	Q								V							0	2	2
muestra 4							Q	Q								V				R			0	3	3
muestra 5							Q	Q								V							0	2	2
muestra 6							Q	Q								V							0	3	3
muestra 7							Q	Q								V							0	2	2
muestra 8							Q	Q								V							0	2	2
muestra 9							Q	Q								V							0	2	2
muestra 10							Q	Q								V							0	2	2
muestra 11							Q	Q								V							0	2	2
muestra 12							Q	Q								V							0	2	2
muestra 13							Q	Q								V				N			0	3	3
muestra 14							Q	Q		I						V				M			0	4	4
muestra 15							Q	Q								V							0	2	2
muestra 16							Q	Q								V							1	5	6
muestra 17							Q	Q								V				E			0	2	2
muestra 18							Q	Q								V							0	3	3
muestra 19							Q	Q								V							0	2	2
muestra 20							Q	Q								V							0	2	2
muestra 21							Q	Q								V					D	P	0	4	4
muestra 22							Q	Q								V							0	2	2
muestra 23							Q	Q								V							0	2	2
muestra 24							Q	Q								V							2	3	5
muestra 25							Q	Q								V							0	2	2
muestra 26							Q	Q								V							1	2	3
muestra 27							Q	Q								V							0	2	2
muestra 28							Q	Q								V							0	2	2
muestra 29							Q	Q								V							0	2	2
muestra 30							Q	Q								V							0	2	2
muestra 31							Q	Q								V							1	3	4
muestra 32							Q	Q								V							0	1	1
Número	1	1	2	1	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 13Tabla diferencias mutaciones B/Yam