



ugr

Universidad
de Granada

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN MEDICINA

Curso 2018-2019

Convocatoria: Junio 2019

CARACTERIZACIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE CIRCULANTES EN TEMPORADA 2018-2019 EN ANDALUCÍA

Autor

José María Navarro García
josekema@correo.ugr.es

Modalidad: Trabajo de investigación

Número de palabras en el texto: 7885

Directores Académicos

Dr. José Gutiérrez Fernández. Departamento Microbiología. UGR

Dra. Mercedes Pérez Ruiz. UGC Microbiología. HUVN





UNIVERSIDAD DE GRANADA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO Y LA DEFENSA PÚBLICA

D. **José Gutiérrez Fernández** , profesor/a del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada, como tutor/a* del trabajo fin de grado de D. **José María Navarro García**, con DNI 75927040-S , de título "**Caracterización de virus de la gripe circulantes en temporada 2018-2019 en Andalucía**".

Informa de que ha sido realizado y redactado por el mencionado alumno, bajo nuestra tutela y dirección, y con esta fecha autorizo a su depósito y defensa pública.

En Granada, a 28 de mayo de 2019

Fdo. José Gutiérrez Fernández



UNIVERSIDAD DE GRANADA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

COMPROMISO DE ORIGINALIDAD

(El presente documento debe adjuntarse cuando el TFG sea presentado para su evaluación)

D. José María Navarro García, con DNI 75927040-S, declara que el presente Trabajo Fin de Grado (TFG) de título "Caracterización de virus de la gripe circulantes en temporada 2018-2019 en Andalucía" es original, no habiéndose utilizado fuentes sin ser citadas debidamente ni haberse presentado previamente para su evaluación como TFG o por cualquier otro motivo. De no cumplir con este compromiso, soy consciente que, de acuerdo con la [Normativa de Evaluación de Calificación de los estudiantes de la Universidad de Granada](#) aprobada por Acuerdo del Consejo de Gobierno de 20 de mayo de 2013 (BOUGR núm. 71, de 27 de mayo de 2013) y modificada por los Acuerdos del Consejo de Gobierno de 3 de febrero de 2014 (BOUGR núm. 78, de 10 de febrero de 2014); de 23 de junio de 2014 (BOUGR núm. 83, de 25 de junio de 2014) y de 26 de octubre de 2016 (BOUGR núm. 112, de 9 de noviembre de 2016), esto *"conllevará automáticamente la calificación numérica de cero [...] independientemente del resto de las calificaciones que el estudiante hubiera obtenido. Esta consecuencia debe entenderse sin perjuicio de las responsabilidades disciplinarias en las que pudieran incurrir los estudiantes que plagien"* (Art. 15. Punto 2).

Y para que conste así lo firmo el día 28 de mayo de 2018.

Abreviaturas aparecidas en texto

CA	Comunidad Autónoma
CNE	Centro Nacional de Epidemiología
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CDC	<i>Centers for Disease Prevention and Control</i>
CGHCG	Casos Graves Hospitalizados Confirmados de Gripe
EDO	Enfermedades de Declaración Obligatoria
EISS	<i>European Influenza Surveillance System</i>
GISAID	<i>Global Initiative on Sharing all Influenza Data</i>
GISN	<i>Global Influenza Surveillance Network</i>
GISRS	<i>Global Influenza Surveillance and Response System</i>
HA	Hemaglutinina
LVSMHUVN	Laboratorio de Virus del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves
MC	Médico centinela
MTV	Medio de transporte de virus
NA	Neuraminidasa
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NICs	<i>National Influenza Centers</i>
NP	Nucleoproteína
OMS	Organización Mundial de la Salud
RT-PCR	Retrotranscripción+reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
RT-PCRtr	RT-PCR en tiempo real
ReLEG	Red de Laboratorios Españoles de Gripe
RVCGA	Red de Vigilancia Centinela de Gripe en Andalucía
TAAN	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos
SV	<i>Shell-vial</i>
SVGE	Sistema de Vigilancia de Gripe en España
VG	Virus de la gripe
VGA	Virus de la gripe A
VGB	Virus de la gripe B
VGC	Virus de la gripe C
VGD	Virus de la gripe D
VRS	Virus respiratorio sincitial

ÍNDICE

ABSTRACT	6
RESUMEN.....	7
I. INTRODUCCIÓN	8
I.1. LA GRIPE: CONCEPTOS GENERALES.....	8
I.2. CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LOS VIRUS DE LA GRIPE.....	9
I.2.1. VARIACIONES MENORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (DRIFT): GRIPE ESTACIONAL.....	11
I.2.2. VARIACIONES MAYORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (<i>SHIFT</i>): GRIPE PANDÉMICA	12
I.2.3. FACTORES DE VIRULENCIA EN EL VIRUS DE LA GRIPE.....	15
I.3. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN GRIPAL EN HUMANOS	16
I.4. CLÍNICA DE GRIPE	18
I.5. DIAGNÓSTICO DE GRIPE	19
I.6. ANTIVIRALES FRENTE AL VIRUS DE LA GRIPE	24
I.7. VACUNAS FRENTE A LA GRIPE.....	24
I.8. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y VIROLÓGICA DE LA GRIPE	26
II. OBJETIVOS	29
III. MATERIAL Y MÉTODOS	30
III.1. PERIODO DE VIGILANCIA.....	30
III.2. TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS	30
III.2.1. TOMA DE MUESTRA	30
III.2.2. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO	31
III.3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO	31
III.3.1. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS.....	32
III.4 ANÁLISIS DE DATOS.....	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
IV.1. MUESTRAS PROCESADAS.....	37
IV.2. TIPOS Y SUBTIPOS GRIPE DETECTADOS EN LA TEMPORADA 2018-2019.....	37
IV.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA	38
IV.3.1. COMPARACIÓN DE VIRUS CIRCULANTES CON VIRUS INCLUIDOS EN VACUNA SUMINISTRADA ESTA TEMPORADA.....	38
IV.3.2. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A OSELTAMIVIR.....	39
IV. CONCLUSIONES	40
VII. AGRADECIMIENTOS	41
VIII. BIBLIOGRAFÍA Y ENLACES.....	42

ABSTRACT

Introduction: Due to the high genetic and antigenic variability, influenza viruses cause annual epidemics and sporadic pandemics. Morbidity and mortality are also high. Annual vaccination is recommended to prevent infection in risk groups and also, effective antivirals are available for treatment of patients with severe disease, Influenza is subjected to world surveillance, through networks comprised by epidemiologists, sentinel physicians and laboratories, being the later responsible for the identification, isolation and characterisation of seasonal viruses, to know their similarity to vaccine strains, mutations associated with antiviral resistance and, if necessary, to early detect possible pandemic viruses.

Objetives: To identify and characterise influenza viruses detected in Andalucía during the 2018-2019 season.

Material and methods: Genetic characterisation by Sanger sequencing of selected influenza virus strains isolated in cell culture in the Reference Laboratory for Influenza at Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Samples proceeded from the Andalusian Sentinel and Severe Cases Surveillance Networks.

Results: From the 73 strains analysed, 51 were H1pdm09 (30 A/Switzerland/3330/2017, 14 A/Michigan/45/2015, 6 A/Switzerland/2656/2017 and 1 A/Paris/1447/2017), and 22 H3 (16 A/Alsace/1746/2018 and 6 A/England/538/2018). None out of 21 strains have shown mutations associated to oseltamivir resistance.

Conclusions: Circulating H3 viruses haven't been antigenically similar to the H3 vaccine strain. All studied H1pdm09 were susceptible to oseltamivir.

Keywords: influenza, characterisation, surveillance

RESUMEN

Introducción: Los virus de la gripe, por su gran variabilidad genética y antigénica y su fácil transmisión provoca epidemias anuales y ocasionalmente pandemias globales. La morbi-mortalidad es alta. Para prevenir la infección, se recomienda la vacunación anual, en grupos de riesgo y además, existen antivirales eficaces para tratamiento en pacientes graves. La gripe está sometida a especial vigilancia, a nivel mundial, a través de redes compuestas por epidemiólogos, médicos centinelas y laboratorios, encargados de la identificación, aislamiento y caracterización de cepas circulantes cada temporada. Todo ello, permite conocer la similitud de estas cepas respecto a las vacunales, si presentan resistencias a antivirales y en su caso, detección precoz de aquellas con potencial pandémico.

Objetivos: Identificar y caracterizar los virus de la gripe circulantes durante la temporada 2018-19 en Andalucía

Material y métodos: Caracterización genética mediante secuenciación Sanger de cepas seleccionadas, aisladas en cultivos celulares en el Laboratorio de Referencia de Gripe del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Las muestras procedían de la Red de Vigilancia Centinela de Andalucía y de casos graves confirmados de gripe en pacientes hospitalizados.

Resultados: De las 73 cepas caracterizadas 51 han sido H1pdm09 (30 A/Switzerland/3330/2017, 14 A/Michigan/45/2015, 6 A/Switzerland/2656/2017 y 1 A/Paris/1447/2017) y 22 H3 (16 A/Alsace/1746/2018 y 6 A/England/538/2018). No se han detectado cepas con mutaciones asociadas a resistencia a oseltamivir en las 21 cepas estudiadas.

Conclusiones: Las cepas circulantes en el caso de gripe H3 no han sido similares antigénicamente a las usadas en la vacuna de esta temporada. Todas las H1pdm09 estudiadas fueron sensibles a oseltamivir

Palabras clave: gripe, caracterización, vigilancia

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA GRIPE: CONCEPTOS GENERALES

La gripe es una enfermedad infecciosa causada por los virus de la familia *Orthomyxoviridae* que incluye los géneros Influenza A, B, C y D.

El virus de la gripe A (VGA) infecta, además de al hombre, a múltiples mamíferos terrestres (cerdos, caballos) y marinos (focas y ballenas), aves domésticas (pollos, patos y pavos) y salvajes (patos, ánsares y gaviotas), siendo en estos últimos donde se encuentra su principal reservorio. El virus de la gripe B (VGB) infecta sólo a humanos, aunque ocasionalmente se ha aislado de otros mamíferos (focas) y el virus de la gripe C (VGC) afecta a humanos y cerdos (Paules & Subbarao, 2017; Uyeki, 2017; Webster & Govorkova, 2014). Recientemente, se ha descrito un nuevo género, virus de la gripe D (VGD), con características bastante similares al VGC y cuyo principal reservorio parecen ser los rumiantes y cerdo, su implicación en patología humana y animal está aún por definir (Su *et al*, 2017).

Desde el punto de vista **clínico**, la gripe es una enfermedad habitualmente autolimitada, que afecta a la población general y cuya morbi-mortalidad es especialmente importante en ciertos grupos de población denominados de “riesgo” (fundamentalmente mayores de 65 años y personas con patologías de base), aunque su distribución es universal y puede afectar a personas de todas las edades.

Anualmente, en la época invernal (generalmente de diciembre a abril en el hemisferio norte) aparecen **epidemias** de gravedad variable, durante las cuales la tasa de ataque puede ser del 10-20% en la población general, y aún mayor en determinados grupos de edad, especialmente en niños. Conlleva un incremento en el número de personas atendidas en centros sanitarios por infecciones respiratorias agudas. Durante estas epidemias aumenta la mortalidad global, atribuible generalmente a complicaciones debidas a la gripe, aunque el número de muertes que provoca la enfermedad es difícil de estimar porque muchas de ellas se asocian a sus complicaciones y no quedan debidamente certificadas (Wright *et al*, 2013). Además, la infección por el virus de la gripe (VG) puede producir síndromes clínicos indistinguibles de los producidos por otros virus respiratorios, así como otros virus respiratorios pueden dar manifestaciones clínicas parecidas a las producidas por el virus de la gripe (CDC 1)

Su naturaleza epidémica y la morbi-mortalidad que puede derivarse de sus complicaciones, unidos al impacto económico que se produce en la comunidad durante las epidemias de gripe, justifican los continuos esfuerzos para prevenir y controlar esta enfermedad.

I.2. CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LOS VIRUS DE LA GRIPE

Los VG pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Se distinguen cuatro géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* e *Influenzavirus D*, basados en las diferencias antigénicas en la **nucleoproteína (NP)** y la **proteína de matriz (M)** (principales proteínas estructurales). El VGA, a su vez, se clasifica en subtipos según las diferencias en sus glicoproteínas de membrana, la **hemaglutinina (HA)** y la **neuraminidasa (NA)** (Paules & Subbarao, 2017; Uyeki, 2017) (Figura 1).

Tienen un diámetro de 80 a 120 nm, son envueltos y con proyecciones superficiales. La envoltura es una bicapa lipídica cuyo origen es la membrana celular de la célula huésped; en su superficie interna está la proteína de matriz M1, que tiene función estructural y es la proteína más abundante del virus.

Atravesando la envoltura y a modo de proyecciones se disponen dos glicoproteínas: HA y NA en los virus A y B. El VGC sólo tiene una proteína con actividad hemaglutinina y esterasa (HE). Otra proteína que se encuentra atravesando la envoltura, formando un canal iónico, es la proteína de matriz M2, que sólo se encuentra en el VGA.

La nucleocápside está formada por un solo tipo de proteína, la nucleoproteína (NP) y por 8 segmentos de ARN de cadena única y sentido negativo en los VGA y VGB. Los VGC y VGD contienen 7 segmentos de ARN. Todas las proteínas descritas en la estructura del virus son codificadas por cada uno de los ocho segmentos de ARN, de forma específica (Wright *et al*, 2013).

VIRUS DE LA GRIPE

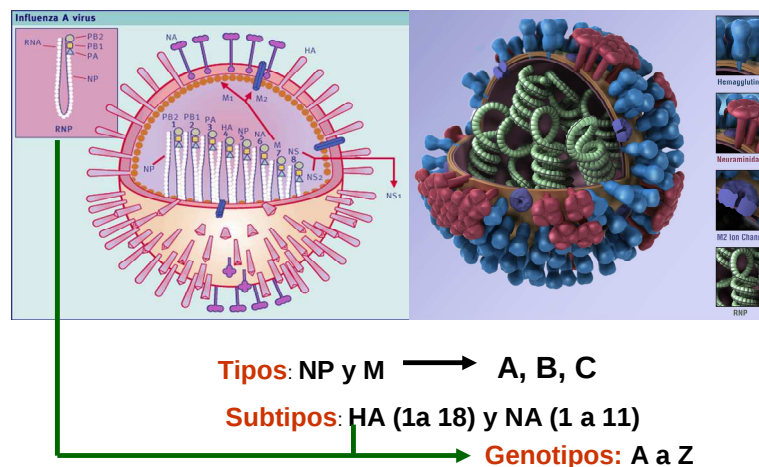


Figura 1. Estructura del virus de la gripe

Las dos proteínas más importantes del virus desde el punto de vista de la infectividad, antigenicidad e inmunidad, son la HA y NA (Wright *et al*, 2013)(Figura 2).

La **HA** es codificada por el segmento 4 del genoma, debe su nombre a su capacidad para aglutinar hematíes. Es la responsable de la unión con el receptor de la célula huésped e interviene en la fusión y penetración del virus dentro de la célula. Es uno de los principales antígenos del virus y se encuentra en la superficie de las células infectadas, siendo desencadenante fundamental de la producción de anticuerpos neutralizantes. Cuando se une a los receptores celulares, debe ser hidrolizada en HA1 y HA2 para permitir la fusión y posterior entrada del virus. Esta hidrólisis es llevada a cabo por proteasas celulares. Los receptores celulares para los virus gripales son oligosacáridos glicosilados que terminan en un extremo de ácido siálico unido a los glicanos a través de un enlace **alfa-2,6** o **alfa-2,3**. Los virus aviares y equinos han mostrado preferencia de unión alfa-2,3, mientras que los virus de gripe que afectan al hombre se unen fundamentalmente con enlaces alfa-2,6 (Byrd-Leotis *et al*, 2017; Dou *et al*, 2018). Los anticuerpos dirigidos frente a HA tienen un papel crucial en la protección frente a la infección. Variaciones en la molécula de HA permiten al virus evadir la inmunidad preexistente.

Actualmente en el VGA hay descritas 18 clases de HA, de H1 a H18. En humanos se han detectado fundamentalmente H1, H2 y H3 y ocasionalmente H5, H7 y H9 (Paules & Subbarao, 2017; Uyeki, 2017; Freidl *et al*, 2015).

La **NA** es codificada por el segmento 6 del genoma y se encuentra atravesando la envoltura viral, al igual que la HA, en forma de homotetrámero. Es también un antígeno importante del VG y contiene determinantes antigénicos comunes para cada subtipo y específicos de cepa. Las principales funciones de la NA son la eliminación de los residuos de ácido siálico de la HA y superficie celular favoreciendo la liberación de las partículas virales y su propagación y expansión a otras células. También participa en el transporte del virus a través de la mucina presente en el tracto respiratorio permitiendo la llegada del virus a la superficie de las células epiteliales del tracto respiratorio superior.

Actualmente se conocen 11 clases de NA de VGA (CDC 1; Freidl *et al*, 2015.), de N1 a N11, de las cuales N1, N2 y ocasionalmente N7 y N9 se han descrito en humanos. Al igual que la HA y otras proteínas virales, la NA parece desempeñar un papel importante en la “discriminación” del hospedador.

En aves salvajes, sobre todo patos, es donde se han encontrado prácticamente todas las combinaciones posibles de las distintas HA y NA (Wright *et al*, 2013).

HEMAGLUTININAS					NEURAMINIDASAS				
Subtipo	Personas	Aves	Cerdos	Murciélagos / Otro	Subtipo	Personas	Aves	Cerdos	Murciélagos / Otro
H1					N1				
H2					N2				
H3				Otros animales	N3				
H4				Otros	N4				
H5					N5				
H6					N6				
H7				Otros animales	N7				Otros animales
H8					N8				Otros animales
H9					N9				
H10					N10				
H11					N11				
H12									
H13									
H14									
H15									
H16									
H17									
H18									

Figura 2. Distribución de tipos de hemaglutininas y neuraminidasas del VGA en las distintas especies del reino animal

I.2.1. VARIACIONES MENORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (*DRIFT*): GRIPE ESTACIONAL

Las **epidemias anuales** de gripe se producen como consecuencia de pequeñas variaciones en la HA y NA: ***drift*** o “**deriva antigénica**”. Éstas son las responsables de la necesidad de revisar y cambiar, en caso necesario, la composición antigénica de las vacunas antigripales de cada nueva temporada. Ocurre por acumulación de una serie de mutaciones puntuales que impide la función de los anticuerpos inducidos por infecciones previas. Por ello, se produce una selección inmunológica y la suplantación de la cepa previa por la cepa variante y el virus puede infectar de nuevo al hospedador. Son cambios relativamente pequeños que se producen con frecuencia (cada año o cada pocos años) en un subtipo del VG (Figura 3).

El VG es, de entre los principales virus respiratorios, el que tiene más capacidad para sufrir cambios antigénicos. Esta variación es frecuente en el VGA,

menos frecuente en el VGB y no se ha asociado al VGC (Wright *et al*, 2013; Kamal *et al*, 2017; Paules & Subbarao, 2017).

En los climas templados, las epidemias de gripe ocurren casi exclusivamente en los meses fríos (generalmente de octubre a abril en el hemisferio norte y de mayo a septiembre en el hemisferio sur), mientras que en los trópicos puede suceder a lo largo de todo el año. Este patrón estacional parece estar relacionado con la reintroducción de los virus en cada estación de un hemisferio a otro, con las condiciones ambientales para la supervivencia del virus y cambios de conducta que favorecen o incrementan la transmisión del virus (hacinamiento en recintos cerrados, p.e) (Kamal *et al*, 2017).

VARIACIONES EN VIRUS INFLUENZA

VARIACIONES MENORES

Presión inmunológica



Figura 3. Esquema de variaciones menores del virus de la gripe

1.2.2. VARIACIONES MAYORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (SHIFT): GRIPE PANDÉMICA

Las **pandemias** de gripe se deben a la aparición de una cepa antigénicamente nueva, con una HA y/o NA perteneciente a un subtipo previamente no detectado en humanos (**shift**), para los cuales la especie humana no tiene inmunidad.

En los siglos XX-XXI se han producido cuatro pandemias gripales, todas causadas por el VGA, por la aparición de los subtipos H1N1 (1918, gripe española), H2N2 (1957, gripe asiática), H3N2 (1968, gripe de Hong Kong) y H1N1 (2009, gripe del cerdo). La mayor pandemia que se recuerda, fue la de 1918-1919, ya que murieron más de 20 millones de personas (índice de mortalidad 2,5%) (Krammer, 2015) (Figura 4).

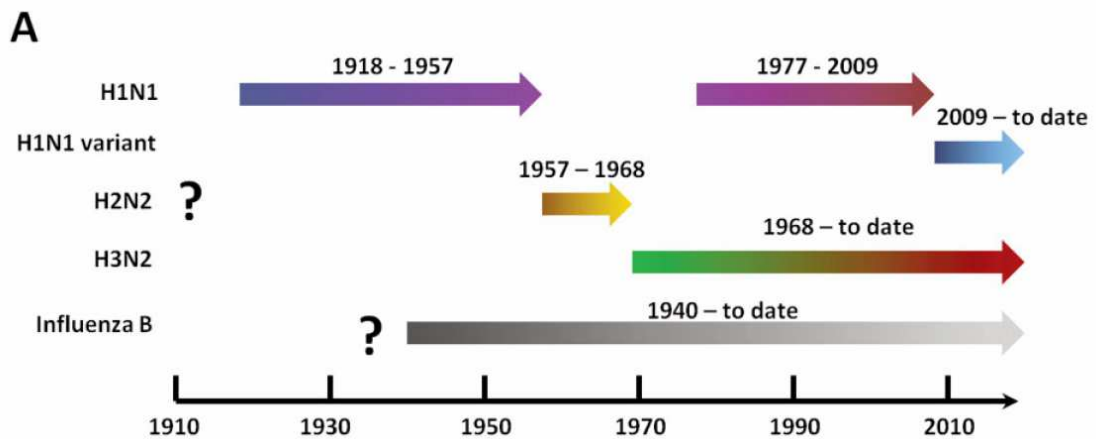


Figura 4. Principales pandemias por virus de la gripe A en siglos XX y XXI (Fuente: Krammer F 2015)

El principal mecanismo biológico responsable de la emergencia de VGs con potencial pandémico es el intercambio de genes entre cepas humanas y animales o entre cepas animales (especialmente porcinas y aviares) y su transmisión a la especie humana (cruce de la barrera interespecie) (Joseph et al, 2017; Pinsent et al, 2016; Lai et al, 2016) (Figuras 5 y 6).

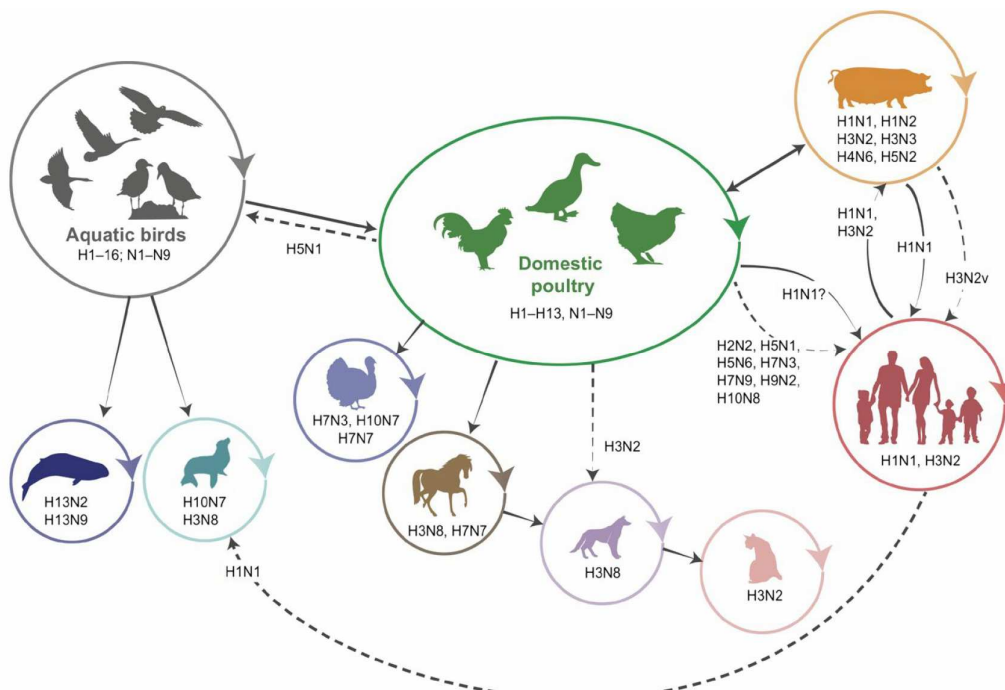


Figura 5. Esquema de transmisión interespecies de gripe A, favorecedora de los mecanismos de reagrupamiento génico y/o transmisión directa (Fuente Joseph et al, 2017)

Existen varias hipótesis para explicar estas variaciones mayores y el posible salto de la barrera interespecie por el virus de la gripe:

- REORDENAMIENTO o REAGRUPAMIENTO GENÉTICO: favorecido porque el virus tiene un genoma segmentado, unido a que los VGA mantienen un amplio reservorio de diversidad genética en diferentes animales (Joseph *et al*, 2017; Pinsent *et al*, 2016).

En 1957, 1968 y 2009 las cepas surgieron por “reagrupamiento” genético; por intercambio de genes (“reordenamiento”) entre virus aviares, de los que provendría una nueva glicoproteína de superficie, y virus humanos, que proporcionarían los genes que permitirán una replicación eficiente.

El reordenamiento es facilitado por la presencia de una tercera especie susceptible de infección tanto por virus aviares como humanos. El cerdo reúne todos estos requisitos, ya que su epitelio presenta receptores tanto para los virus aviares como para los humanos. Por ello, las pandemias a menudo surgen en áreas geográficas donde los humanos, cerdos y aves acuáticas, viven en estrecha proximidad (Joseph *et al*, 2017; Pinsent *et al*, 2016).

-TRANSMISIÓN DIRECTA del virus de animales a humanos sin intermediario. La mayor parte de estos saltos interespecie no prosperan, porque los virus tienen poca capacidad para ser transmitidos secundariamente a humanos y así iniciar una pandemia. No obstante, desde que en agosto de 1997, cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) confirmó la identificación de un virus A (H5N1) aislado en Hong Kong de muestras respiratorias de un niño fallecido con un cuadro gripal y síndrome de Reye (Ku *et al*, 1999), se han venido describiendo casos, esporádicos o en brotes pequeños, de infección por virus H5N1, H9N2 y H7N7 por transmisión directa de aves a humanos (Gripe aviar) (Lai *et al*, 2016; Krammer, 2015).

Los nuevos VG de origen no humano, tienen el potencial para iniciar una infección pandémica si poseen la capacidad para transmitirse de persona a persona. No obstante, en la actualidad, los estudios al respecto demuestran la escasa o nula transmisibilidad entre los contactos de los individuos infectados por estos subtipos aviares (Lai S, 2016). Pero no puede ignorarse que tras la trasgresión de la barrera de especie, los virus precisan de un tiempo de adaptación al nuevo huésped.

VARIACIONES EN VIRUS INFLUENZA

VARIACIONES MAYORES (Shift)

(reagrupamiento genético
cepas de distinto origen)



Figura 6. Esquema de mecanismos favorecedores de aparición de cepas pandémicas de gripe

I.2.3. FACTORES DE VIRULENCIA EN EL VIRUS DE LA GRIPE

En la patogenicidad se pueden implicar multitud de determinantes interrelacionados, incluyendo las propiedades de los componentes del virus, la interacción de los componentes con los elementos de la célula huésped y los factores medioambientales e inmunológicos.

Una de las diferencias entre cepas avirulentas o poco virulentas y cepas virulentas, es el espectro de enzimas capaces de hidrolizar la proteína **HA**. Así, las cepas poco virulentas sólo podrían ser hidrolizadas por proteasas presentes normalmente en la secreción del tracto respiratorio. Por el contrario, las cepas virulentas podrían ser activadas por una gran variedad de enzimas proteolíticas presentes en diversos órganos y tejidos, permitiendo la diseminación de la infección (Schrauwen *et al*, 2014).

Hay evidencias para pensar que la **NA** juega también un papel importante en la patogenicidad. Su capacidad para unirse al plasminógeno, representa un factor de virulencia para las cepas gripales de origen aviar (Laporte & Naesens, 2017). Esta glicoproteína se uniría y secuestraría al plasminógeno, incrementando la concentración local de proteasas.

El gen que codifica la proteína **PB2** también pueden participar de una forma indirecta en la patogenicidad. El aminoácido de la posición 627 en la PB2 ha sido implicado en la mayor virulencia humana del virus H5N1. Los H5N1 que son virulentos en ratones poseen la lisina en esta posición, mientras que los avirulentos en ratones y otros virus de la gripe A aviares, poseen ácido glutámico (mutación E627K). Esta diferencia representa una adaptación del virus H5N1 para la replicación en células de mamíferos (Schrauwen *et al*, 2014).

Se ha descrito una secuencia de aminoácidos en la proteína no estructural (NS1), que puede contribuir a la virulencia de los subtipos H5N1. La terminación carboxilo de la NS1 de la mayoría de los H5N1 contiene una secuencia de aminoácidos: ESEV (Glutámico-Serina-Glutámico-Valina). Éstos median la unión a un dominio proteico de la superficie celular llamado PDZ, mientras, la terminación carboxilo de la NS1 de menor virulencia en el virus de la gripe A en humanos, normalmente contiene una secuencia diferente: RSKV (Arginina-Serina-Lisina-Valina), la cual no se une al dominio PDZ. Consecuentemente, la capacidad de unirse a un dominio PDZ por la NS1 de los subtipos H5N1 se correlaciona con virulencia en humanos (Krug, 2015).

También se ha comprobado que tiene un papel importante en la patogenicidad la proteína viral **PB1-F2** de localización mitocondrial (Kamal *et al*, 2017). Se ha demostrado que variantes de esta proteína que contienen diversas mutaciones en el gen, son responsables de inducir apoptosis en las células monocíticas y favorecer la sobreinfección bacteriana.

I.3. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN GRIPAL EN HUMANOS

El inicio de la infección por VG se produce por la **entrada del virus** en la mucosa del tracto respiratorio. La infección se adquiere vía aérea (estornudar, toser o hablar) de las secreciones respiratorias que contienen gran cantidad de virus en el momento de la enfermedad en personas infectadas. La diseminación del virus por pequeñas partículas de aerosol pueden depositarlo tanto en vías respiratorias altas (nasofaringe) e intermedias (tráquea), y menos frecuentemente en el tracto respiratorio inferior (bronquiolos y alvéolos). También puede adquirirse la infección por contacto directo con las secreciones contaminadas. En este caso, se deposita el virus sólo en nasofaringe. La cantidad de virus necesaria para infectar el tracto respiratorio inferior es muy pequeña, necesitándose dosis cien veces mayores para infectar la nasofaringe (Wright *et al*, 2013; Kash & Taubenberger, 2014).

El VGA es relativamente estable en partículas de aerosoles; con bajas temperatura y humedad. En la mucosa respiratoria puede ser neutralizado por los anticuerpos locales provocados por infecciones anteriores y por los inhibidores inespecíficos existentes en el moco y el sistema mucociliar. Tras la adsorción a las células de la mucosa, el virus inicia su ciclo de replicación que dura de 4 a 6 horas. (Wright *et al*, 2013)

El VG se puede encontrar en las secreciones nasales un día antes o el mismo día del comienzo de los síntomas, incrementándose la concentración hasta alcanzar un pico a las 48 horas, declinando lentamente en 6-8 días. En niños infectados, es posible recuperar el virus desde 1 ó 2 días del comienzo de los síntomas hasta 13 días después. Las personas inmunodeprimidas pueden excretar el virus durante semanas (CDC 1).

La **patología** que acompaña a la infección por VG resulta de la destrucción celular causada por la replicación viral. El virus se excreta desde las células del epitelio columnar antes de que cese su actividad metabólica y sean desprendidas a la luz del tracto respiratorio. La infección también modifica sustancialmente la actividad de los cilios (Uyeki, 2017; Kash & Taubenberger, 2015; Webster & Govorkova, 2014).

El VG induce cambios en el tracto respiratorio inferior. En gripe no complicada, existe una inflamación de la laringe, tráquea y bronquios acompañada de edema localizado que puede producir estrechamiento significativo de bronquios terminales y bronquiolos. Los casos fatales de neumonía por VG, muestran grados variables de infiltrados de células intersticiales y edema alveolar. A partir del tercero al quinto día del comienzo de los síntomas, comienza la regeneración del epitelio, estando presentes simultáneamente, procesos destructivos y procesos reparativos (Londino *et al*, 2017; Herold S 2015).

Se ha conseguido aislar el virus de otras localizaciones anatómicas como: músculo, hígado, orina, líquido pericárdico y líquido cefalorraquídeo, lo que, junto con los estudios sobre la viremia sugieren que el virus puede diseminarse, aunque no se ha demostrado la replicación fuera del tracto respiratorio (Wright *et al*, 2013; Sellers *et al*, 2017)

Con respecto a la respuesta inmunológica, la infección con VG da lugar a una resistencia a la reinfección por virus homólogos. Además, se ha descrito que la protección en el tiempo frente a un subtipo es variable y que la infección no induce protección cruzada para otros subtipos o entre los tipos A y B. La infección conlleva una respuesta inmunológica local y sistémica y también una respuesta celular T citotóxica, las cuales juegan un papel importante en la recuperación y la resistencia a la reinfección (Kash & Taubenberger, 2014).

La **respuesta humoral** se debe al desarrollo de anticuerpos frente a las glicoproteínas HA, NA, proteína M1 y nucleoproteína (en algunas personas también frente a la proteína M2).

La producción de IgM, IgA e IgG frente a la HA aparece a las dos semanas de la inoculación del virus. La respuesta de anticuerpos es más rápida en las reinfecciones. Estos anticuerpos son neutralizantes de la infectividad del virus, mientras que los anticuerpos producidos frente a la NA no son neutralizantes, pero reducen la liberación eficiente del virus desde las células infectadas.

Se desarrollan también anticuerpos secretores en saliva, secreciones nasales, esputo y material de lavados broncoalveolares, que son mayoritariamente de tipo IgA e IgG, alcanzándose el pico de los títulos a los 14 días después de la infección (Wright *et al*, 2013).

En cuanto a la **respuesta celular**, las células infectadas por VG pueden ser lisadas por anticuerpos en presencia de complemento, por citotoxicidad dependiente de anticuerpos o por acción de linfocitos T citotóxicos.

Los linfocitos T citotóxicos se han relacionado con la reducción de los niveles de replicación del virus en adultos que tienen niveles bajos en suero de anticuerpos frente a HA y NA.

La respuesta de los linfocitos T citotóxicos de memoria podría jugar un papel en la disminución de la gravedad de la infección, como sugieren los casos en individuos con defecto de la inmunidad celular donde la infección es más grave (Kash & Taubenberger, 2014).

I.4. CLÍNICA DE GRIPE

Aunque puede haber gran variabilidad, desde cuadros muy leves, similar al resfriado común, a extremadamente graves; en general, la gripe se caracteriza por el comienzo brusco de síntomas como cefalea, fiebre, escalofríos, mialgias, malestar general y anorexia acompañados por signos respiratorios, principalmente tos seca, secreción nasal y dolor de garganta. La temperatura se eleva dentro de las 24 horas del comienzo de los síntomas y desciende gradualmente en dos o tres días, aunque en ocasiones puede permanecer hasta una semana (CDC2, Paules & Subbarao, 2017; Uyeki, 2017).

Las mucosas nasal y faríngea están enrojecidas (a veces la faringe no presenta ninguna alteración a pesar del dolor de garganta). A medida que los signos y síntomas sistémicos disminuyen, las molestias respiratorias son más evidentes. La tos suele ser el más molesto de los síntomas. Estos signos, suelen mantenerse hasta 3 ó 4 días

después de desaparecer la fiebre, aunque la tos puede persistir durante más tiempo (Wright *et al*, 2013).

En la gripe no complicada, la enfermedad aguda generalmente se resuelve de 3 a 5 días, y la mayoría de los pacientes se recuperan en una semana. En algunos casos, los síntomas de debilidad (astenia postgripal) pueden persistir durante varias semanas, sobre todo en los ancianos (CDC 2).

El cuadro clínico descrito se produce con cualquier subtipo de VGA y parece que también con VGB, aunque algunos sugieren que la enfermedad causada por este último puede ser más leve e incluso que pueden existir diferencias en la presentación clínica dependiendo del subtipo de VGA. La infección con VGC, cuando ocurre, suele causar un cuadro leve similar al resfriado común y cursar sin fiebre (Wright *et al*, 2013).

Complicaciones

Las tasas más altas de hospitalización se dan en las edades extremas, en niños menores de 1 año y en ancianos. En los primeros, existe falta de inmunidad y sus vías aéreas son de pequeño calibre, lo que incrementa la probabilidad de obstrucción por la respuesta inflamatoria debida a la infección. La presencia de alguna patología de base aumenta la posibilidad de complicaciones. En los ancianos, la mayor gravedad y complicaciones de la gripe generalmente son debidas a ciertas patologías de base, como enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diabetes, disfunción renal, inmunodepresión y asma. Se ha estimado que la presencia de cualquier condición de riesgo incrementa la probabilidad de muerte por neumonía y/o gripe.

Las complicaciones más importantes son las pulmonares, destacando la neumonía viral primaria producida por el propio virus gripal y las neumonías bacterianas secundarias (Prasso & Deng, 2017). Además pueden ocurrir complicaciones en lugares extrapulmonares: sinusitis y otitis media, complicaciones cardíacas (miocarditis, miopericarditis), síndrome de Reye (complicación hepática y del sistema nervioso central que ocurre casi exclusivamente en niños entre los 2 y 16 años de edad y tiene una alta mortalidad: del 10 al 40%), etc (Sellers *et al*, 2017).

I.5. DIAGNÓSTICO DE GRIPE

El diagnóstico de la gripe se realiza fundamentalmente por criterios clínicos. La presentación clínica de la gripe puede variar considerablemente con la edad del paciente. El síndrome típico descrito anteriormente se presenta generalmente en

adolescentes y adultos jóvenes. Se ha sugerido, basándose principalmente en estudios de pacientes hospitalizados, que el patrón clínico de la gripe puede ser más variable en niños que en adultos (Paules & Subbarao, 2017).

En pacientes con enfermedades de base y que pueden beneficiarse del tratamiento específico con antivirales, es necesario realizar un diagnóstico etiológico. El diagnóstico de laboratorio es, además, la base de los sistemas de vigilancia virológica de la gripe, ya que permite disponer de los virus que circulan en cada temporada para caracterizarlos desde el punto de vista antigénico y genético.

En la actualidad, existen varias técnicas para diagnosticar en el laboratorio las infecciones por el VG y cada laboratorio debe decidir cuáles son las más adecuadas para llevar a cabo, en función del volumen de trabajo y su infraestructura. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), fundamentalmente **RT retrotranscripción-PCR** (RT-PCR), son hoy día las técnicas de referencia. Las dianas recomendadas para detectar los distintos tipos de VG son los genes M (matriz), NP (nucleoproteína), HA y NS. La mayoría de los métodos comerciales para detección de virus gripales, están diseñados para detectar VGA y VGB. La investigación VGC, dado que no existen métodos comerciales para hacerla, se limita casi exclusivamente a laboratorios perteneciente a las redes de vigilancia. La metodología más ampliamente empleada sería la RT-PCR en tiempo real (RT-PCRtr), que permite detectar los productos generados en cada ciclo de amplificación mediante el empleo de una sonda fluorescente que se unen al ADN amplificado y cuya fluorescencia es recogida por el aparato. La cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo es directamente proporcional a la cantidad de producto generado (Figura 7) (Pérez-Ruiz *et al.* 2019).

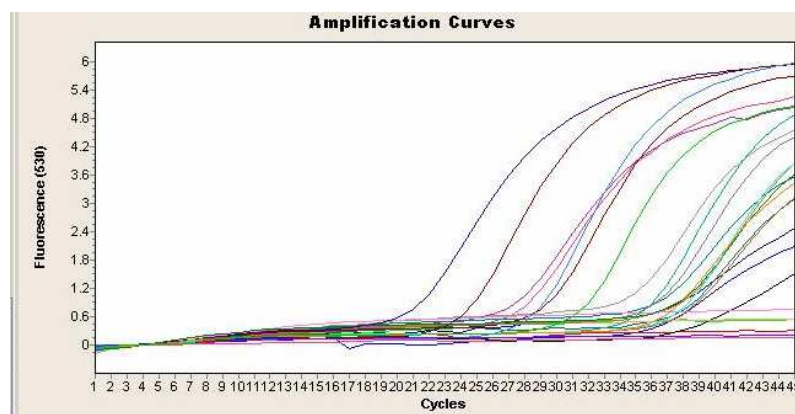


Figura 7. Ejemplo de curva de amplificación mediante RT-PCRtr de VG

El **cultivo** tradicional en líneas celulares adecuadas, es lento y sólo se utiliza en laboratorios de referencia; se prefiere la técnica de cultivo rápido (Shell-vial) (SV), que combina la sensibilidad del cultivo tradicional con la rapidez en la obtención de

resultados. Actualmente el cultivo viral se utiliza en los laboratorios de referencia para obtener aislados de los virus circulantes para estudios de caracterización genética y antigénica. Las cepas y aislados humanos de los VG se designan con la siguiente **nomenclatura**:

Tipo/Lugar/identificación/año (subtipo o linaje)

Ej: A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), B/Colorado/06/2017 (linaje Victoria).

Muy utilizadas en el diagnóstico, aunque menos sensibles y específicas que las anteriores, son las técnicas de **detección de antígenos** (inmunofluorescencia, inmunocromatografía...), cuya principal ventaja es la rapidez en la obtención de resultados y la facilidad para su ejecución (Vemula *et al.* 2016).

Aunque la demostración de seroconversión de anticuerpos frente a los antígenos de gripe, entre sueros en fase aguda y convaleciente, es diagnóstica, las técnicas serológicas son poco utilizadas para este fin, por su tardanza en la obtención de resultados

Para conocer las características virológicas de los virus circulantes, se utilizan técnicas de **secuenciación de ADN**.

La **secuenciación de ADN** es un proceso que determina el orden o la secuencia de los nucleótidos en cada uno de los genes presentes en el genoma del virus.

Los CDC y otros laboratorios de salud pública de todo el mundo han estado secuenciando los genes de los virus de la gripe desde la década de 1980. Actualmente, estas secuencias de genes están recopiladas en bases de datos como **GenBank** y más recientemente **GISAID** [*Global Initiative on Sharing all Influenza Data*, (<https://www.gisaid.org/>)], para que puedan ser utilizadas por investigadores de salud pública, lo que permite a los laboratorios comparar los genes de los VG anteriores y vacunales.

Las diferencias relativas que se observan en un grupo de virus de la gripe se organizan y se muestran en un gráfico llamado "**árbol filogenético**" (Figura 8). Estos presentan cuán estrecha es la relación entre cada uno de los virus. Por lo general, los árboles filogenéticos de los virus de la gripe muestran la similitud que hay entre los genes de hemaglutinina (HA) o neuraminidasa (NA). Cada secuencia de un virus específico tiene asignada una rama del árbol. Mientras más alejados están los virus en el eje horizontal del árbol filogenético, más diferentes genéticamente son unos de otros (CDC 3).

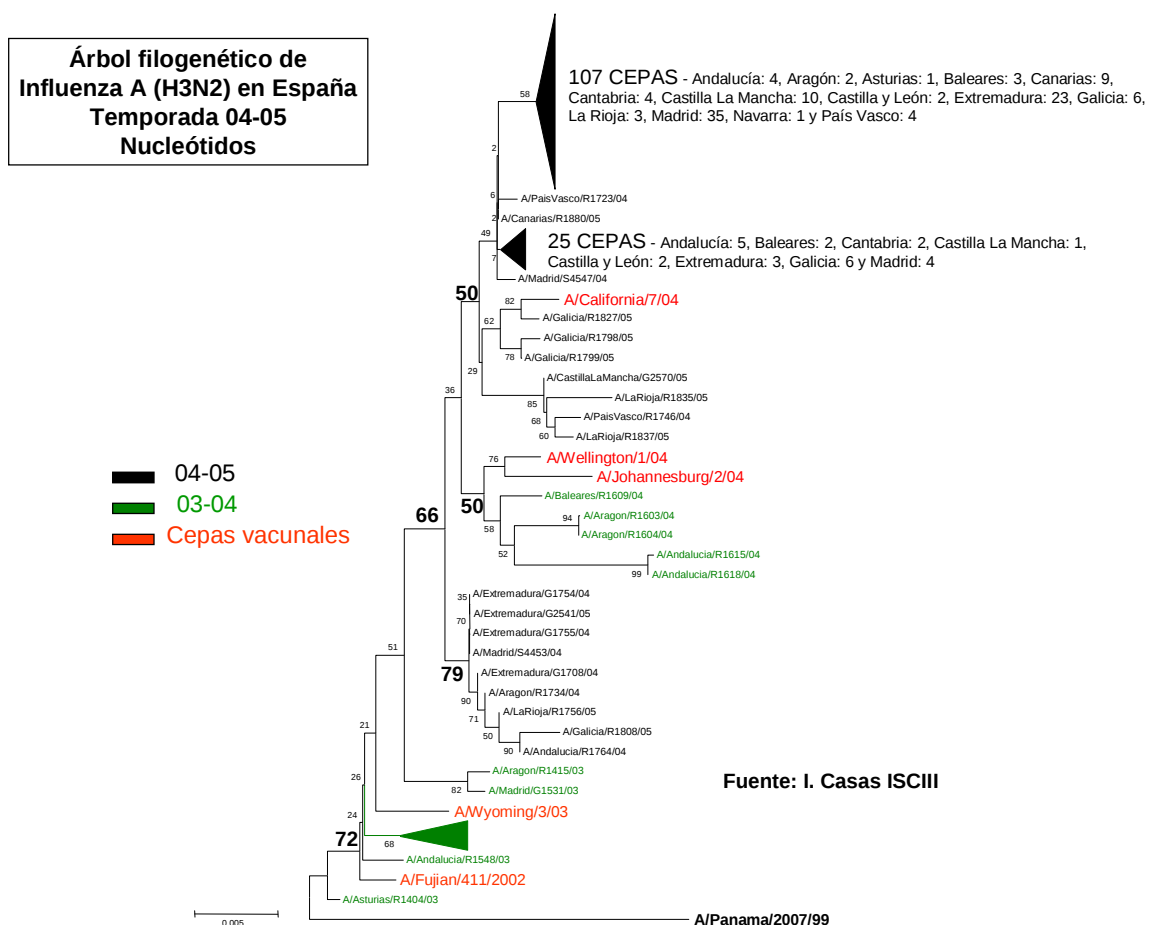


Figura 8. Árbol filogenético en el que se representan las cepas de gripe H3N2 detectadas en España en las temporadas 2003-2004 y 2004-2005, respecto a las cepas vacunales de esas temporadas.

Los principales métodos de secuenciación del genoma del VG son (Pérez-Ruiz *et al*, 2019):

-Pirosecuenciación

Es una técnica de secuenciación de ADN basada en la detección de la liberación de un grupo pirofosfato cuando se incorpora un nucleótido en una secuencia nueva de ADN. Tras una cascada de reacciones enzimáticas, el grupo pirofosfato liberado emite una señal de luz. La señal emitida es proporcional al nº de nucleótidos que se van incorporando a la cadena de ADN. Su principal limitación es el tamaño del fragmento que permite secuenciar, que suele ser corto. La pirosecuenciación permite

detectar resistencia a inhibidores de la neuraminidasa de los virus de la gripe A H1N1, H3N2 y H5N1 y marcadores de resistencia a adamantanos.

-Secuenciación Sanger

Es un método basado en la parada en la elongación de la cadena de ADN por parte de la ADN polimerasa (secuencasa) cuando se incorpora un dideoxi nucleótido trifosfato (ddNTP) en lugar del correspondiente dNTP. El tubo de reacción incluye por tanto dNTPs, tampones, ADN plimerasa, un cebador y los ddNTP marcados. La incorporación selectiva a la cadena de ddNTP resulta en frgamentos de ADN de varios tamaños conteniendo en el extremo de la cadena el ddNTP fluorescente correspondiente. Estas señales son recogidas por el secuenciador, que realiza electroforesis y emite un electroferograma con la secuencia obtenida y los picos de fluorescencia de cada nucleótido en la posición correspondiente

Es el método más empleado en la Vigilancia de la Gripe para obtener las secuencias de los genes HA de los virus circulantes cada temporada, así como para detectar cepas resistentes a antivirales.

-Secuenciación masiva o NGS (next-generation sequencing)

Es una tecnología actualmente en desarrollo, con un enorme potencial para el diagnóstico y vigilancia de la gripe. Genera enormes cantidades de secuencias que posteriormente requieren de un proceso bioinformático laborioso para ser analizadas y depuradas, lo que constituye su mayor desventaja, dado que no existen protocolos validados para VG.

Ofrece una serie de ventajas con respecto a la secuenciación *Sanger*: menor coste ya que en una única serie se obtienen muchas secuencias, preparación de la muestra simplificada y permite detectar todas las variantes que pueden estar presentes en una muestra.

Usando NGS se ha conseguido información de la secuencia completa de aislados de gripe, así como la identificación de los subtipos H3N2, H1N1pdm09 y de gripe B simultáneamente. También ha permitido secuenciar el genoma completo del VGA emergente H7N9. La tecnología NGS permite también investigar la expresión génica del hospedador en respuesta a la infección viral en el tracto respiratorio.

La **secuenciación del gen de la HA** y su posterior análisis filogenético tiene como principal objetivo obtener información acerca de la semejanza de los virus circulantes con la cepa utilizada en la vacuna de cada temporada.

La **secuenciación del gen de la NA** tiene como objetivo la identificación de mutaciones asociadas a resistencia a los antivirales inhibidores de la NA (oseltamivir, peramivir y zanamivir). La mutación asociada a resistencia a oseltamivir, que es el antiviral más comúnmente empleado, y por tanto, la más estudiada, es el cambio de una histidina por una tirosina en el aminoácido 275 (**H275Y**).

I.6. ANTIVIRALES FRENTE AL VIRUS DE LA GRIPE

Los antivirales que combaten los VG son un complemento importante de la vacuna contra la gripe en el control de la enfermedad. Actualmente se utilizan tanto como tratamiento, como para prevención en situaciones concretas. Están comercializados para su uso, tres grupos de antivirales frente al VG (CDC 4, Lackenbya *et al*, 2018):

- Los **adamantanos**: amantadina y rimantadina, que actúan frente a la proteína del conducto iónico M2 de los VGA. Por consiguiente, sólo son activos contra los VGA. Dado que se registran altos niveles de resistencia (>99%) a adamantanos entre los VGA H3N2 y H1N1pdm09 en circulación, no son recomendados actualmente para el tratamiento antiviral o la quimioprofilaxis de los VG.

- **Inhibidores de la neuraminidasa viral: fosfato de oseltamivir** oral, **zanamivir** por inhalación y **peramivir** intravenoso. Actúan tanto frente a VGA como VGB, y son los más utilizados.

- **Inhibidores de la endonucleasa: baloxavir marboxil** oral. Es el de más reciente incorporación, actúa también frente a VGA y VGB, inhibiendo la endonucleasa dependiente de la cápsula que interfiere en la transcripción del ARN viral e impide la replicación del virus.

La resistencia antiviral a los inhibidores de la neuraminidasa y endonucleasa entre los virus de la gripe en circulación es actualmente baja. Puede ocurrir esporádicamente o surgir en ciertos pacientes (p. ej., inmunodeprimidos) durante o tras el tratamiento con antivirales (Naesens *et al*, 2016).

I.7. VACUNAS FRENTE A LA GRIPE

La medida de control más eficaz frente a la gripe es la inmunización anual de ciertos grupos de población considerados de alto riesgo de padecer complicaciones

asociadas a gripe. Debido a la elevada capacidad del VG de sufrir variaciones en sus antígenos de superficie, la composición de las vacunas debe revisarse cada año a fin de asegurar que se ajustan a las propiedades antigénicas de los virus circulantes (CDC 5; Ting *et al*, 2017).

En general existen 2 tipos de vacunas frente a la gripe: las procedentes de virus cultivados en huevo o líneas celulares específicas inyectables (utilizan **virus inactivados o antígenos recombinantes**) y las que utilizan **virus vivos atenuados**, administradas vía intranasal.

La composición de la vacuna antigripal de cada temporada se hace siguiendo la recomendación de la OMS (hemisferio norte) y de la Unión Europea, sobre la base de la información disponible acerca de la prevalencia de aislamientos de cepas concretas que circulan en todo el mundo. En el hemisferio norte, las cepas son seleccionadas a finales del mes de febrero; los laboratorios farmacéuticos trabajan en la elaboración de las vacunas durante la primavera y el verano, y son distribuidas en septiembre y octubre. Contiene clásicamente tres variedades distintas del VG, dos del VGA (H3N2 y H1N1) y una del VGB, que son las que se han detectado con más frecuencia en las epidemias de gripe que están circulando en todo el mundo y que serían las que con mayor probabilidad podrían ser responsables de la epidemia de la temporada actual. Desde el año 2009, la cepa de H1N1 incluida en la vacuna corresponde a la cepa pandémica de ese año, que se designa como H1N1pdm09. Hoy día, ya existen vacunas tetravalentes, que incluyen, además de las 2 cepas de VGA, los 2 linajes de VGB circulantes en nuestros días.

Las vacunas pueden utilizarse desde los 6 meses de edad.

La vacunación para prevenir la gripe, tiene una importancia particular para las personas que corren alto riesgo de presentar complicaciones graves:

- Mayores de 65 años de edad
- Pacientes con enfermedades crónicas del aparato cardiovascular y del aparato respiratorio.
- Pacientes con enfermedades del sistema inmunitario o que estén tomando medicamentos que los afectan, como corticosteroides, quimioterapia o radioterapia.
- Pacientes en tratamiento crónico con ácido acetil salicílico
- Diabéticos u obesos mórbidos
- Embarazadas

También, debería vacunarse el personal sanitario y trabajadores de servicios públicos esenciales, que tendrían que hacer frente a una epidemia potencialmente agresiva (policías, bomberos, etc) (Grohskopf *et al*, 2018).

En la temporada 2017-2018, las cepas recomendadas para la vacuna trivalente por la OMS, en el hemisferio norte, fueron: similar A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09), similar a A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) y una cepa similar a B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria).

Por su parte, los virus incluidos en la vacuna trivalente de la temporada 2018-2019 son: similar a A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09), similar a A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), y similar a B/Colorado/06/2017 (linaje Victoria) (Grohskopf *et al*, 2018).

I.8. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y VIROLÓGICA DE LA GRIPE

Es imprescindible una adecuada vigilancia virológica y epidemiológica de la enfermedad que permita detectar y caracterizar precozmente los VG circulantes y evaluar su capacidad de difusión en la población. Estos factores, junto con la rapidez en el intercambio de información a nivel nacional e internacional, son los ejes básicos de la vigilancia actual de la enfermedad.

La evolución de los VG circulantes se controla a nivel mundial por medio de sistemas de vigilancia. En 1952 nace la Red Mundial de Vigilancia de la gripe (*Global Influenza Surveillance Network* [GISN]), integrada por una extensa red internacional de laboratorios coordinada por la OMS. En mayo del 2011 pasó a llamarse Sistema Mundial de Vigilancia y Respuesta de la gripe (*Global Influenza Surveillance and Response system* [GISRS]). (WHO 1).

Actualmente, el GISRS incluye a 141 centros nacionales de gripe (*National Influenza Centers* [NICs]) ubicados en 110 países que tienen como misión aislar y caracterizar los VG circulantes en su área geográfica. Estos virus se comparan posteriormente entre sí en 5 Centros Colaboradores de la OMS de Referencia e Investigación en Gripe, que hay en el mundo (Londres, Melbourne, Pekín, Tokio y Atlanta), a fin de detectar las nuevas variantes y seleccionar las que deben ser incluidas en la vacuna de la temporada siguiente.

La declaración por parte de los países de los datos virológicos y epidemiológicos, así como el acceso a la información generada, se realiza a través de un sistema denominado **FluNet** coordinado por la OMS (Tabla 1).

Tabla 1. Organización de los Sistemas de Vigilancia de la gripe a Nivel mundial
(Fuente SVGE-2)

Nivel	Red de vigilancia de gripe	Coordinación de la red de vigilancia	Sistema de notificación a la red	Laboratorios que integran la red	Coordinación de la red de laboratorios
Mundial	GISRS	WHO	FluNet	NICs (141) WHO CC (5)	WHO
Europeo	EISN	ECDC WHO Europe	TESSy	ERLI-Net (37)	PHE, RIVM, FCI
Nacional	ScVGE	CNE	Web ScVGE	ReLEG (18)	CNM

CNE Centro Nacional de Epidemiología; CNM Centro Nacional de Microbiología; ERLI-Net European Reference Laboratory Network for Human Influenza; ECDC European Centre for Disease Prevention and Control; EISN European Influenza Surveillance Network; FluNet OMS influenza surveillance; GISRS Global Influenza Surveillance and Response System; PHE Public Health England (London); NICs National Influenza Centers; FCI Francis Crick Institute (London); ReLEG Red de Laboratorios Española de Gripe; RIVM National Institute of Public Health and the Environment (The Netherlands); ScVGE Sistema centinela de Vigilancia de Gripe en España; TESSy The European Surveillance System; WHO CC World Health Organization Collaborating Centers.

En Andalucía, desde 1995 existe la **Red de Vigilancia Centinela de la Gripe de Andalucía** (RVCGA), compuesta por médicos centinelas de distintos Centros de Salud, y el Laboratorio de Virus del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves (LVSMHUVN) de Granada.

La población mínima cubierta por RVCGA es del 1,94% de la población de la CA, representativa de la misma en términos de edad, ámbito poblacional y dispersión geográfica

La RVCGA está integrada en el **Sistema de Vigilancia de Gripe en España** (SVGE 1)

Además, desde la pandemia del 2009 se amplió la vigilancia de gripe a las formas graves de la enfermedad, mediante la vigilancia de los **casos graves hospitalizados confirmados de gripe** (CGHCG).

En la temporada 2017-18 en Andalucía, como en el resto de España, hubo cocirculación de gripe A H1N1pdm09, H3N2 y B. La evolución histórica por temporada desde 2009 de los tipos y subtipos de VG circulantes se muestra en la Figura 9.

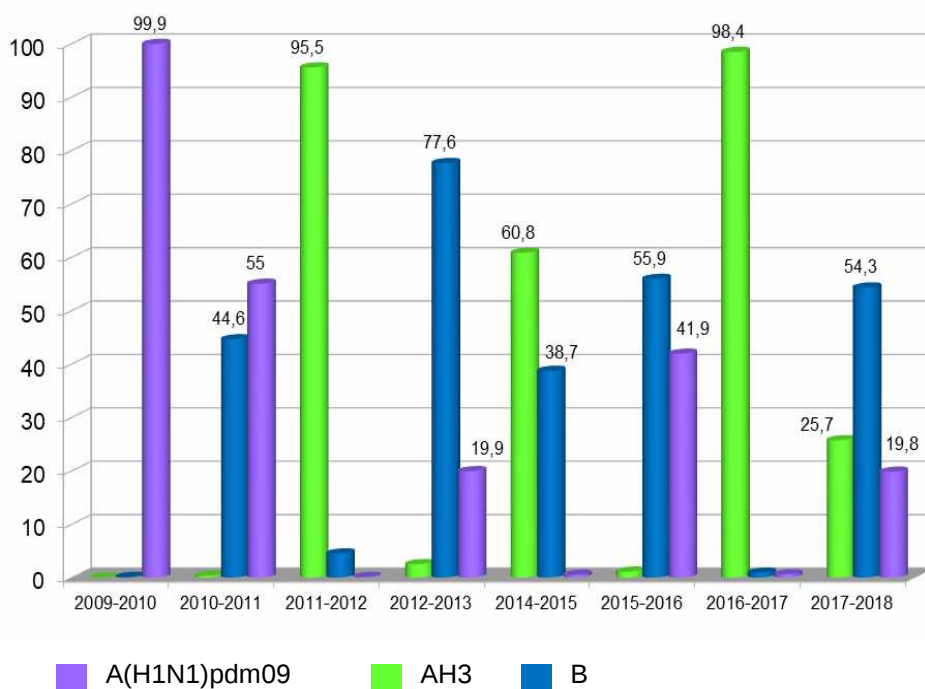


Figura 9. Virus de la gripe detectados las últimas 8 temporadas en Andalucía. Fuente: Laboratorio de Referencia de Gripe de Andalucía

Tras caracterización genética, se demostró que estas cepas correspondían a los siguientes genotipos:

B/Phuket/3073/2013 (linaje Yamagata)

A/Singapore/16-0019/2016 (H3N2)

A/HongKong/4801/2014 (H3N2) Clado 3C.2a

A/Norway/3806/2016 (H3N2) Clado 3c.2a1

A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09) subclado 6B.1

De todas ellas sólo A/HongKong/4801/2014 (H3N2) y A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09), son similares a las cepas vacunales de esa temporada, por lo que la vacuna ha podido ser poco eficaz en infecciones por VGB y en muchas de las infecciones por gripe H3N2.

Durante la temporada 2017-2018, no se detectó ninguna cepa portadora de la mutación H275Y en el gen de la NA, que confieren resistencia a oseltamivir. A nivel nacional se detectó esta mutación en dos virus H1N1pdm09 (SVGE 2).

II. OBJETIVOS

General: Detectar y caracterizar genéticamente los virus gripales que han circulado en Andalucía durante la temporada 2018-2019, a partir de muestras procedentes de la RVCGA y de la Vigilancia de CGHCG.

Específicos:

1. Descripción general de los virus circulantes en Andalucía en la temporada 2018-2019.
2. Caracterizar genéticamente el gen de la HA de los virus circulantes durante la temporada 2018-2019 para comparar su similitud con las cepas vacunales correspondientes a esta temporada.
3. Analizar la presencia o ausencia de la mutación H275Y en el gen de la NA de los virus H1N1pdm09, que determina resistencia a oseltamivir.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. PERIODO DE VIGILANCIA

La temporada de vigilancia de gripe abarca desde la semana epidemiológica 40 de 2018 (octubre) hasta la semana 20 de 2019 (mayo). Para el presente trabajo se han utilizado muestras enviadas hasta el día 30 de abril de 2019.

III.2. TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

Los médicos centinelas tomaron muestras de pacientes que respondían a la definición de caso de gripe y las enviaron al LVSMHUVN. Además, se enviaron muestras de pacientes con cuadros graves por gripe, previamente diagnosticados en su hospital de origen.

Definición de caso de gripe

La definición de caso de gripe adoptada en el Sistema de Vigilancia de la Gripe en España es:

1. Aparición súbita de los síntomas y al menos uno de los cuatro síntomas generales siguientes: fiebre o febrícula, malestar general, cefalea, mialgia; y al menos uno de los tres síntomas respiratorios siguientes: tos, dolor de garganta, disnea y
2. Ausencia de otra sospecha diagnóstica

III.2.1. TOMA DE MUESTRA

Se utilizan un exudado nasal y otro faríngeo, combinados en un mismo vial con medio de transporte de virus (MTV), conservado a 4°C hasta el momento del envío (Figura 10).



Figura 10. Medio de transporte y escobillones para toma de muestras de virus

III.2.2. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO

Las muestras debidamente identificadas, se enviaron al laboratorio de manera inmediata a 4°C. En los casos en que la muestra no pudo enviarse inmediatamente, se mantuvo en frigorífico a 4°C. Las muestras se transportaron con triple envase homologado y adecuadamente rotuladas. El transporte se realizó utilizando una empresa de mensajería con capacidad para transportar material biológico (Figura 11).

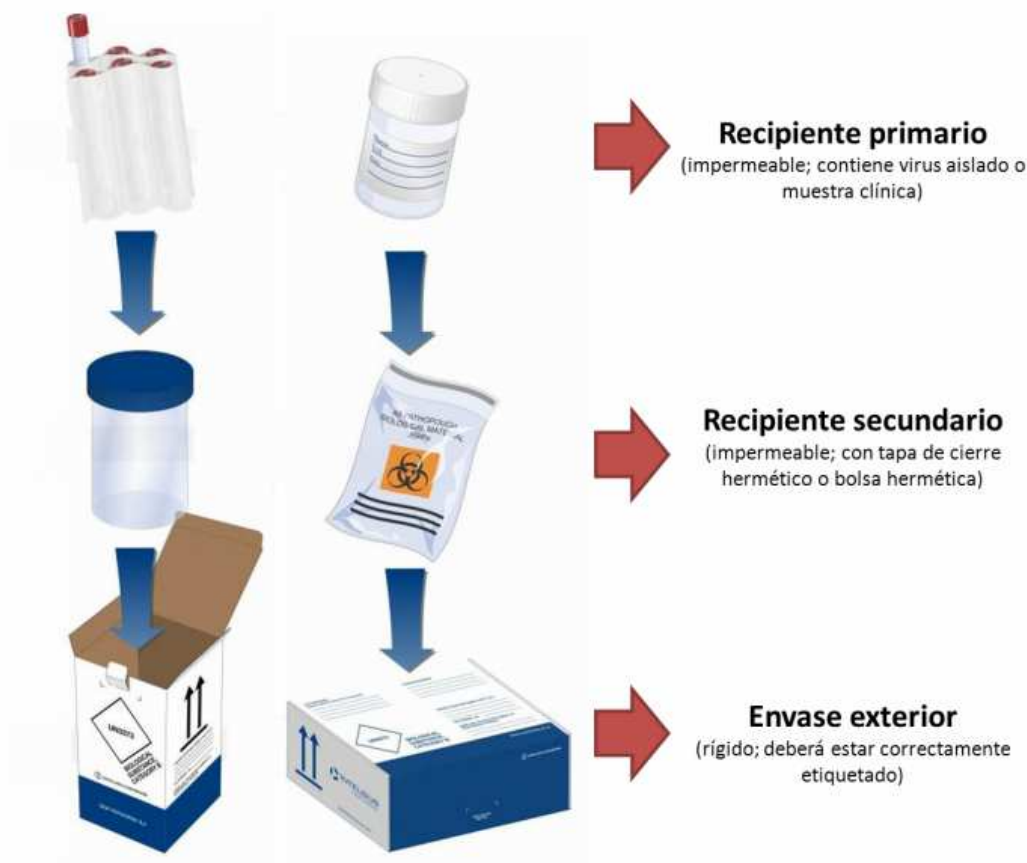


Figura 11. Ejemplo de triple embalaje de bioseguridad para envío de muestras de gripe al laboratorio de Referencia (Fuente: SVGE 1)

III.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

En la figura 12, se muestra el procesamiento general seguido en el laboratorio para detección y caracterización de virus gripales en las muestras centinelas.



Figura 12. Esquema de procesamiento de muestras para estudio de gripe en Laboratorio de Referencia de Gripe de Andalucía

El diagnóstico de gripe en las muestras recogidas se basa inicialmente RT-PCRtr frente para detectar y diferenciar VGA, VGB y VGC. En casos positivos a VGA, con posibilidad de detectar e identificar virus de la gripe A, B y C. En casos positivos a VGA, se realiza determinación del subtipo.

En una selección de los casos positivos detectados, se procede a cultivo viral para obtención del aislado sobre el que se realizan los estudios de caracterización genética.

III.3.1. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS

-RT-PCRtr

Previo a la RT-PCRtr, hay que extraer y purificar los ácidos nucleicos de la muestra. Para ello, se utilizó el ensayo QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini kit, en el equipo de extracción automática Qiasymphony (Qiagen). Este sistema permite la extracción automática de hasta 96 muestras y la posterior preparación de los tubos de RT-PCRtr (Figura 13, izquierda).



Figura 13. Izquierda, equipo Qiasymphony con los dos módulos de extracción de ácidos nucleicos (módulo SP, izquierdo) y de preparación de la PCR (módulo AS, derecho); derecha, Versant kPCR para la RT-PCRtr

La RT-PCRtr utiliza dos dianas frente al VGA de los genes M y NP y una diana frente a VGB y VGC dirigida frente al gen NP. Las sondas específicas de cada tipo viral están marcadas con un fluoróforo diferente que emite fluorescencia a distintas longitudes de onda y que por tanto, se pueden diferenciar durante la lectura. Esto permite que se puedan incluir varias dianas en un mismo tubo de reacción. Para la RT-PCRtr se utilizó un equipo Versant kPCR (Siemens) (Figura III.3.1.a, derecha).

-Cultivo viral

El procedimiento utilizado es la inoculación mediante centrifugación de las muestras, en tubos de fondo plano, que contienen la línea celular MDCK-SIAT1, que son células Madin Darby de riñón de perro, con el plásmido SIAT1 que contiene el gen de la 2,6-sialotransferasa humana, para la expresión específica de los residuos alfa-2,6 en los receptores celulares, a semejanza de los existentes en el tracto respiratorio superior). Las líneas celulares se incuban a 33-35°C durante 48h. El medio de mantenimiento de las células debe llevar tripsina, que es necesaria para la activación de la HA. Se identificará el crecimiento del virus en las células mediante técnicas de inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Técnica de Shell-vial) (Figura 14).

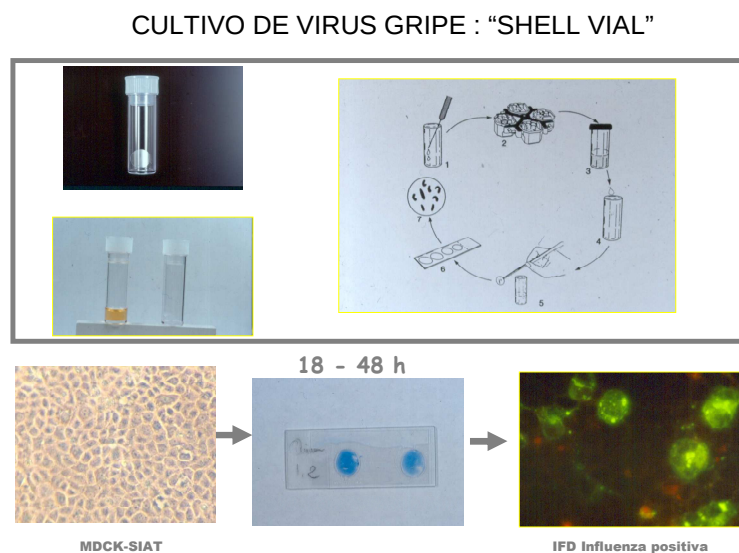


Figura 14. Esquema de técnica cultivo–centrifugación (“shell-vial”), para aislamiento de virus de la gripe

-Caracterización genética de los virus gripales

Tras el aislamiento de los virus en cultivo, se seleccionaron una serie de cepas de diferente tipos y subtipos para estudio genético del gen de la HA y de la NA.

El procedimiento constó de los siguientes pasos:

- 1º Extracción y purificación de los ácidos nucleicos de los aislados (como se describe anteriormente).
- 2º RT-PCR de un fragmento de la HA de (590-1000 pares de base, pb) y de un fragmento del gen de la NA de H1pdm09 (450-700 pb), siguiendo el protocolo del Centro Nacional de Microbiología.
- 3º Electroforesis en agarosa al 1% para detectar los productos específicos de la PCR (Figura 15).

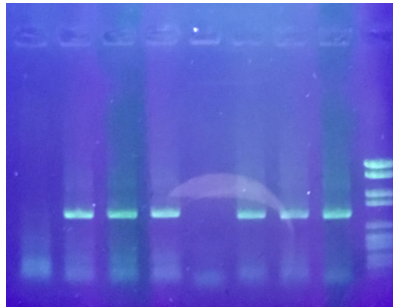


Figura 15. Electroforesis el agarosa al 1% de los productos de amplificación del gen de la HA de H1pdm09

- 4º Purificación de los productos de PCR para eliminar restos de cebadores no deseados en la secuenciación.
- 5º Secuenciación Sanger, en equipo ABI377, en el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (Granada, CSIC). Se hacen dos secuenciaciones por muestra, una con cada uno de los cebadores usados en la PCR, para realizar la lectura de la secuencia en ambas direcciones y confirmar posibles mutaciones en el virus analizado.
- 6º Análisis de secuencias, para lo cual se realizan los siguientes procesos:

- Visualización del electroferograma en el programa Chromas (Figura 16).

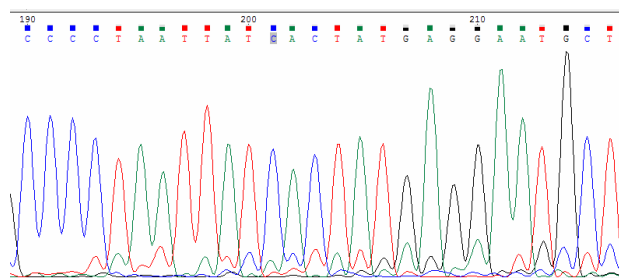


Figura 16. Electroferograma tras secuenciación de un fragmento del gen de la NA del VGA

- Análisis de los posibles errores en la secuenciación mediante comparación de la secuencia problema con las disponibles en GenBank, utilizando la herramienta de internet BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*). Esto te permite corregir los huecos (“gaps”) comparando el alineamiento obtenido con los picos del electroferograma (Figura 17).

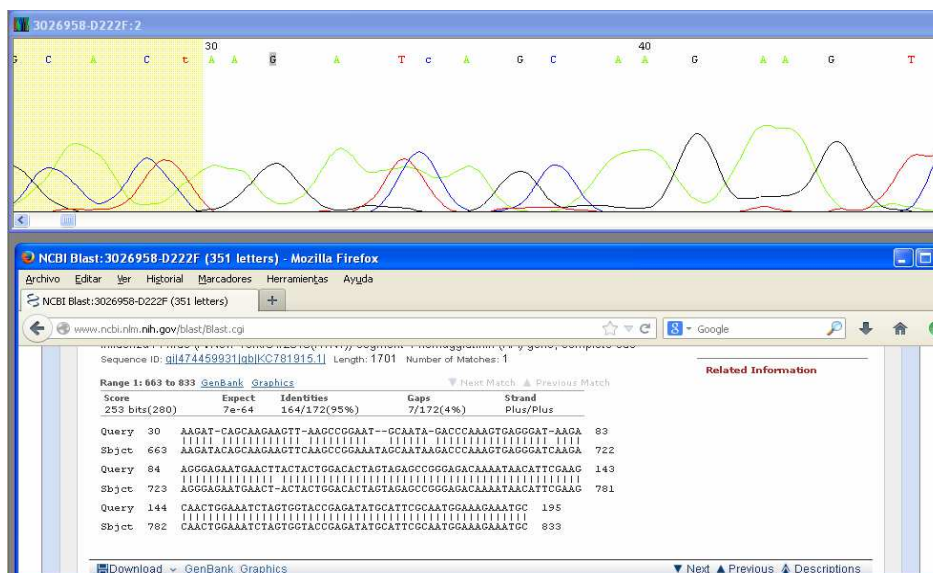


Figura 17. Ejemplo de comparación entre electroferograma en Chromas y alineamiento en BLAST, que muestra los errores (gaps) de lectura de secuencia a corregir

- Abrir las dos secuencias depuradas con el programa MEGA, alinear ambas entre sí, para obtener una única secuencia del tamaño del producto de PCR.
- Alinear con las secuencias consenso de cada tipo o subtipo de esa temporada (disponibles en el informe del ECCDC, *Influenza virus characterisation report*) y alinear éstas con la secuencia problema (Figura 18).

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	Seq
1. HA67F	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
2. HA71F	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
3. HA71R	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
4. HA72F	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
5. HA72R	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
6. HA74F	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
7. HA74R	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
8. HA75F	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
9. HA75R	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
10. HA76F	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
11. HA76R	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
12. HA69R	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
13. HA70F	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
14. HA70R	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
15. HA A/California/07/2009	RERSPRAMGHSPSTY*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
16. HA A/Bayern/69/2009	RERSPRAMGHSPSTY*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
17. HA A/Lviv/16/2009	RERSPRAMGHSPSTY*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
18. HA A/Astrakhan/1/2011 Grupo 5	RERSPRAMGHSPSTY*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
19. HA A/Hong Kong/5699/2012 Grupo 6A	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
20. HA A/Slovenia/2903/2015 6B.1 clon 37	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
21. HA A/Paris/1447/2017 6B.1	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
22. HA A/Switzerland/2656/2017 6B.1	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
23. HA A/Switzerland/3330/2017 6B.1 clon 35	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR
24. HA A/Michigan/45/2015 (vacunal)	RERSPRAYGHSPSTYYC*PTKSLSECRICFCGDIKIQEVQAGNSNKTQSESR

Figura 18. Ejemplo de alineamiento en MEGA de secuencias de proteína HA con secuencias consenso de H1pdm09

- Realizar análisis filogenético (mediante método de *maximum likelihood* o *neighbour joining*) en el programa MEGA para determinar a qué grupo pertenecen los virus analizados (Figura 19).

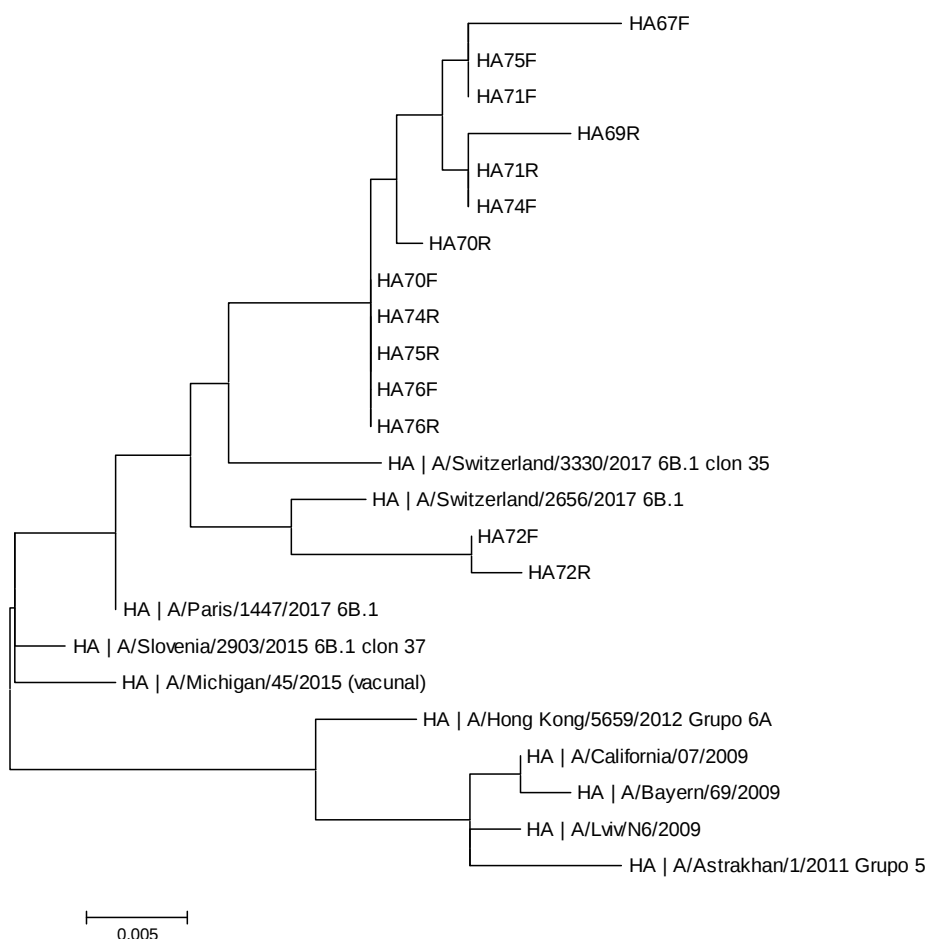


Figura 19. Árbol filogenético de los virus con nº 67-76, del subtipo H1pdm09 aislados en la temporada 2018-2019

III.4 ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados de la determinación de gripe en muestras respiratorias se extrajeron de la base de datos del LVSMHUVN y se exportaron los datos de los virus detectados y la procedencia de la muestra a hoja de cálculo Excel.

Además, se registraron los resultados de caracterización genética de los virus analizados de la temporada en hoja de cálculo Excel.

Para análisis de los resultados se ha realizado un estudio estadístico descriptivo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. MUESTRAS PROCESADAS

Para este trabajo, se han estudiados muestras recibidas hasta 30 de abril de 2019. En total se han procesado en el Laboratorio de Referencia de gripe de Andalucía 2464 muestras nasofaríngeas, 779 procedentes de la vigilancia centinela y 1685 de casos graves confirmados de gripe. El mayor porcentaje de muestras se recibió entre las semanas 3 de 2019 y la 10 de 2019, coincidiendo con el periodo epidémico de gripe esta temporada.

IV.2. TIPOS Y SUBTIPOS GRIPE DETECTADOS EN LA TEMPORADA 2018-2019

Se ha detectado virus de la gripe en el 48,3% de las muestras recibidas. El 99,6% ha sido VGA (54,6% virus H1pdm09 y el 45% virus H3) (Figura 20). En Andalucía como en el resto de España y Europa, esta temporada prácticamente sólo ha circulado VGA, con predominio de H3 o H1pdm09 según el país estudiado (Eurosurveillance).

Respecto a las dos temporadas anteriores (ver figura 9 en introducción), en 2016-2017, sólo circuló H3 y a diferencia de la temporada 2017-2018 no ha circulado prácticamente VGB.

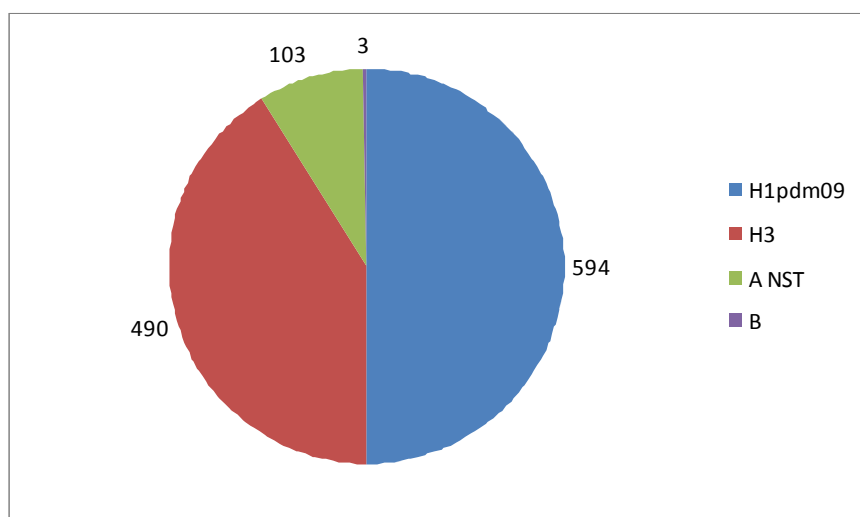


Figura 20. Distribución de los 1088 virus de la gripe A (H1 pdm09 y H3) y B detectados en el LVSMHUV en Andalucía hasta el 30 de abril de 2019. NST, no subtipable

IV.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

Para este estudio se han utilizados 73 cepas de VGA seleccionadas aleatoriamente de las aisladas en distintos periodos de esta temporada tanto de vigilancia centinela como de casos graves hospitalizados. No hemos estudiado VGB, porque hasta el cierre del estudio sólo se han detectado 4 cepas (0,3% de los positivos), insuficiente para poder extraer alguna conclusión.

Los resultados de nuestro estudio se muestran en tabla 2

Tabla 2. Caracterización genética de 73 virus de la gripe A aislados en Andalucía en temporada 2018-2019, en base a hemaglutinina

VGA H1pdm09	n (%)	VGA H3	n (%)
A/Michigan/45/2015 (vacunal)	14 (27,4)	A/Alsace/1746/2018(H3N2)	16 (72,7)
A/Paris/1447/2017*	1 (1,9)	A/England/538/2018(H3N2)	6 (27,3)
A/Switzerland/2656/2017*	6 (11,8)		
A/Switzerland/3330/2017*	30 (58,8)		
Total (H1pdm09)	51	Total H3	22

*Estos virus pertenecen al mismo subclado que el virus vacunal A/Michigan/45/2015

Los resultados con VGA H3 son superponibles a los obtenidos en el CNM en cepas analizadas de todo el país, donde hasta la fecha, se han caracterizado 585 VGA (H3N2), de las que 256 han sido A/Alsace/1746/2018 y 320 A/England/538/2018. Sólo 9 corresponden a otros linajes. Las cepas H1pdm09, que han circulado en Andalucía, también han sido similares a las que han circulado en el resto del país, todas similares antígenicamente a A/Michigan/45/2015 (SVGE 3).

IV.3.1. COMPARACIÓN DE VIRUS CIRCULANTES CON VIRUS INCLUIDOS EN LA VACUNA SUMINISTRADA ESTA TEMPORADA

Todas las cepas H1pdm09 eran análogas antígenicamente a la cepa vacunal usada esta temporada A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09).

Todos los virus H3N2 caracterizados, **son diferentes antígenicamente** al virus vacunal A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016.

Estos resultados son semejantes a los comunicados por el CNM en cepas analizadas de todo el país y a las recogidas en resto de Hemisferio Norte, lo que ha llevado a tomar la decisión de que para la vacuna que se va a usar en la temporada 2019-2020 se modifique su composición respecto a la utilizada esta temporada; recomendando a los fabricantes que en representación del VGA H3, se utilice la cepa A/Kansas/14/2017, similar antigénicamente a la A/Alsace/1746/2018 que, como ha sucedido en Andalucía, ha sido la más prevalente en el hemisferio norte esta temporada.

IV.3.2. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A OSELTAMIVIR

Se analizó la resistencia a oseltamivir conferida por la mutación H275Y en el gen de la NA en 21 virus seleccionados de pacientes graves o inmunodeprimidos y ninguno demostró dicha mutación. Hasta la fecha atendiendo a los datos reportados por el CNM en el resto de España tampoco se han detectado cepas portadoras de esta mutación. En Europa de 897 cepas investigadas, sólo en 4 se ha detectado la misma (Eurosurveillance)

IV. CONCLUSIONES

1. En Andalucía durante la temporada 2018-2019, la epidemia de gripe ha sido provocada casi exclusivamente por virus de la gripe A.
2. Los virus de la gripe A detectados han sido el 54,6% virus H1pdm09 y el 45% virus H3.
3. Genéticamente, los virus H1pdm09 circulantes han sido similares a la cepa A/Michigan/45/2015 contenida en la vacuna, mientras los virus H3 en su mayoría han sido similares a A/Alsace/1746/2018 o A/England/538/2018, muy diferentes antigénicamente a la cepa vacunal de esta temporada.
4. No se ha detectado la mutación H275Y en el gen de la neuraminidasa, que confiere resistencia a oseltamivir, en ninguna de las cepas estudiadas.

VII. AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Profesor José Gutiérrez Fernández y Dra Mercedes Pérez Ruiz, por su dirección, orientación y consejos continuos.

A todo el personal, Facultativos y Técnicos del Laboratorio de Referencia de Virus, por admitirme en su equipo de trabajo estos meses, por su ayuda y paciencia, sin la cual no hubiera nunca podido llevar a cabo este TFG.

Y sobre todo, a mi familia, padres y hermanas, por estar siempre ahí.

VIII. BIBLIOGRAFÍA Y ENLACES

Byrd-Leotis L, Cummings RD, Steinhauer DA. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 17;18(7). pii: E1541

CDC 1. Center for Disease Control and Prevention: Influenza Type A Viruses. En: www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm. Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

CDC 2. Center for Disease Control and Prevention: Clinical Signs and Symptoms of Influenza. En: www.cdc.gov/flu/professionals/acip/clinical.htm. Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

CDC 3. Center for Disease Control and Prevention: Influenza Virus Genome Sequencing and Genetic Characterization. En: www.cdc.gov/flu/professionals/laboratory/genetic-characterization.htm. Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

CDC 4. Center for Disease Control and Prevention 5: What You Should Know About Flu Antiviral Drugs. En: www.cdc.gov/flu/treatment/whatyoushould.htm?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fflu%2Fantivirals%2Fwhatyoushould.htm. Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

CDC 5. Center for Disease Control and Prevention: Influenza Vaccination: A Summary for Clinicians. En: www.cdc.gov/flu/professionals/vaccination/vax-summary.htm. Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H, Daniels R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol.* 2018; 9:1581.

Eurosurveillance. Influenza surveillance in the European Region. En: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900125;jsessionid=wsc8lxOLc85ZRcGZygMu8I3.i-0b3d9850f4681504f-ecdclive>. Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

Freidl GS, Binger T, Müller MA, de Bruin E, van Beek J, Corman VM, Rasche A, Drexler JF, Sylverken A, Oppong SK, Adu-Sarkodie Y, Tschapka M, Cottontail VM, Drosten C, Koopmans M. Serological evidence of influenza A viruses in frugivorous bats from Africa. *PLoS One.* 2015 May 12;10(5).

Grohskopf LA, Sokolow LZ, Broder KR, Walter EB, Fry AM, Jernigan DB. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States, 2018-19 Influenza Season. *MMWR Recomm Rep.* 2018; 67:1-20.

Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GR. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J.* 2015;45:1463-78.

Joseph U, Su YC, Vijaykrishna D, Smith GJ. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza Other Respir Viruses.* 2017;11:74-84.

Kamal RP, Alymova IV, York IA. Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 29;19(1). pii: E96.

Kash JC, Taubenberger JK. The role of viral, host, and secondary bacterial factors in influenza pathogenesis. *Am J Pathol.* 2015;185:1528-36.

Krammer F. Emerging influenza viruses and the prospect of a universal influenza virus vaccine. *Biotechnol J.* 2015;10:690-701.

Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Curr Opin Virol.* 2015 ;12:1-6.

Ku AS, Chan LT. The first case of H5N1 avian influenza infection in a human with complications of adult respiratory distress syndrome and Reye's syndrome. *J Paediatr Child Health.* 1999; 35:207-9.

Lackenby A , Besselaar TG , Daniels RS, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. *Antiviral Res.* 2018; 157:38-46

Lai S, Qin Y, Cowling BJ, Ren X, et al. Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997-2015: a systematic review of individual case data. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:e108-e118.

Laporte M, Naesens L. Airway proteases: an emerging drug target for influenza and other respiratory virus infections. *Current Opinion in Virology* 2017, 24:16–24

Londino JD, Lazrak A, Collawn JF, Bebock Z, Harrod KS, Matalon S. Influenza virus infection alters ion channel function of airway and alveolar cells: mechanisms and physiological sequelae. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;313:L845-L858.

Naesens L, Stevaert A, Vanderlinden E. Antiviral therapies on the horizon for influenza. *Curr Opin Pharmacol.* 2016 ;30:106-15.

Paules C, Subbarao K. Influenza. *Lancet.* 2017;390:697-708.

Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu-Gámez S, Pedrosa-Corral M, Navarro-Marí JM. Métodos de diagnóstico molecular de la gripe. En: *Los virus de la gripe. Pandemias, epidemias y vacunas.* Ortiz de Lejarazu, ed. 2019, en prensa.

Pinsent A, Fraser C, Ferguson NM, Riley S. A systematic review of reported reassortant viral lineages of influenza A. *BMC Infect Dis.* 2016 Jan 5;16:3.

Prasso JE, Deng JC. Postviral Complications: Bacterial Pneumonia. *Clin Chest Med.* 2017;38:127-38.

Prasso JE, Deng JC. Postviral Complications: Bacterial Pneumonia. *Clin Chest Med.* 2017;38:127-38.

Schrauwen EJ, de Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:479-90.

Sellers SA, Hagan RS, Hayden FG, Fischer WA 2nd. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir Viruses.* 2017;11:372-93.

SVGE 1. Sistema de Vigilancia de la Gripe en España. Guía de procedimientos para la vigilancia de gripe en España. En: <http://www.isciii.es/isciii/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd->

[enfermedades/Guia_procedimientos_vigilancia_gripe_16102017.pdf](#) . Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

SVGE 2. Sistema de Vigilancia de la Gripe en España. Informe de vigilancia de la gripe en España. Temporada 2017-2018. En: [vgripe.isciii.es/documentos/20172018/InformesAnuales/Informe_Vigilancia_GRIPE_2017-2018_27julio2018.pdf](#) . Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

SVGE 3. Sistema de Vigilancia de la Gripe en España. Informe de vigilancia de la gripe en España. Temporada 2018-2019, semana 20 2019. En [http://vgripe.isciii.es/documentos/20182019/boletines/grn202019.pdf](#) . Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. Virulence. 2017;8:1580-91.

Ting EEK, Sander B, Ungar WJ. Systematic review of the cost-effectiveness of influenza immunization programs. Vaccine. 2017;35:1828-43.

Uyeki TM. Influenza. Ann Intern Med. 2017 Sep 5;167(5): ITC33-ITC48.

Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. Viruses. 2016 Apr 12;8(4):96.

Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. Ann N Y Acad Sci. 2014;1323:115-39.

WHO 1. World Health Organization. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). En: [www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/](#) . Fecha último acceso: 26 de abril de 2019.

Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses, in Knipe DM and Howley eds Fields Virology, 6th ed: 1186-1243. 2013. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Ziegler T, Mamahit A, Cox NJ. 65 years of influenza surveillance by a World Health Organization-coordinated global network. Influenza Other Respi Viruses. 2018;12:558–65.