



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA DEL ECUADOR**

PROGRAMA DE MAESTRIA EN BIOLOGIA COMPUTACIONAL

**PROYECTO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA LA
OBTENCION DEL TITULO DE MAGISTER EN BIOLOGIA
COMPUTACIONAL**

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN DE LA HEMAGLUTININA
DEL VIRUS DE INFLUENZA H3 EN EL ECUADOR 2015-2020**

MVZ. ALFREDO BRUNO CAICEDO, MGS.

QUITO, ECUADOR

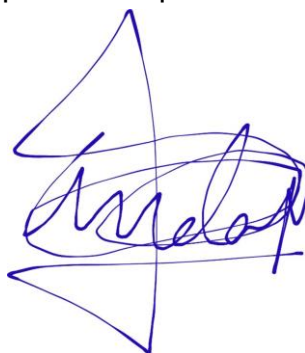
2022

MGTR. CHARLES ESCOBAR TERÁN
DECANO
FACULTA DE INGENIERÍA
PUCE

CERTIFICACIÓN

El suscrito, en mi calidad de Director de Tesis **CERTIFICO QUE:** he revisado el trabajo de Titulación, denominado: **VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE INFLUENZA H3 EN EL ECUADOR 2015 - 2020**, el mismo que ha sido elaborado y presentado por el estudiante, MVZ Alfredo Bruno Caicedo; quien cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador para este tipo de estudios.

Atentamente,



Dr. Jesús Abraham Avelar Rivas

Irapuato, 29 de Diciembre de 2022

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, mi Madre Eulalia Caicedo y hermano Mario Bruno por todo su cariño y respaldo de familia, mi esposa Doménica de Mora por su amor, apoyo incondicional en todo momento desde antes, durante y después de la maestría, a su señor Padre el Dr. Iván de Mora por sus sabios consejos.

Una dedicatoria especial en memoria de mi Padre Giulio Cessare Bruno Moggia, científico investigador quien formó mi carácter, principios, valores y me brindó la fuerza necesaria para enfrentar la vida en todas las circunstancias. En memoria de mi tío, el cual tengo el honor de llevar su nombre Alfredo Bruno Moggia, valiente Héroe y combatiente de la II Guerra Mundial.

A mi tutor, Abraham Avelar, quien con su experiencia y sabiduría supo guiarme de manera acertada para la elaboración de la presente tesis, a mi grupo especial de compañeros de maestría quienes estuvieron desde el inicio y durante el año académico pude valorar su calidad profesional, humana y académica, de igual manera agradezco a mi pequeño grupo de amigos del colegio y la universidad quienes siempre han estado en los buenos y malos momentos. A las autoridades de la Universidad Agraria del Ecuador por incentivar el desarrollo profesional y apoyar en todo sentido la ejecución de esta Maestría. Agradezco a la Red Global de Vigilancia y Respuesta de la Influenza de la OMS (GISRS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EEUU (CDC), plataforma GISAID, MSP e INSPI por la contribución científico - técnica y un agradecimiento particular a todos los grupos de Rock clásicos, que con su potencia musical han brindado la energía necesaria que incentiva a muchos investigadores a nivel local e internacional durante varias generaciones.

Cum luce salutem.

RESPONSABILIDAD

La responsabilidad, derecho de la investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones que aparecen en el presente Trabajo de Titulación corresponden exclusivamente al Autor y los derechos académicos otorgados a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

MVZ. Alfredo Bruno Caicedo

C. I. 0919289850

INDICE GENERAL

1. DATOS GENERALES.....	9
2. RESUMEN / SUMMARY	9
3. DESCRIPCION DETALLADA DE LA PROPUESTA	11
3.1 Justificación	11
3.2 Planteamiento del Problema:	12
3.3 Contextualización del tema	12
3.4 Objetivos:.....	14
3.4.1 Objetivo general (Resuelve/ Soluciona el problema principal	14
3.4.2. Objetivos específicos (Resuelve/ Soluciona los problemas secundarios).....	14
3.5 Marco Teórico.....	14
3.5.1. Antecedentes o marco referencial.....	14
3.5.2. Marco teórico	15
3.6 Metodología	19
3.8 Limitaciones del estudio	19
4. Análisis de Datos:	21
4.1 Identificación de clados por año.....	21
4.2.- Evolución molecular de clados.....	23
4.4 Conclusiones	37
5. Bibliografía:.....	39, 47
6. ANEXOS:.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de clados/subclados por año del subtipo H3, Ecuador 2015 - 2022	22
Figura 2. Diferencia de aminoácidos de la región de la Hemaglutinina que son diferentes entre las cepas vacunales y los clados circulantes en Ecuador 2015 - 2022.....	25
Figura 3. Diversidad de cambios de nucleótidos entre las secuencias ecuatorianas de la región de la Hemaglutinina del subtipo H3, 2015 - 2022.	26
Figura 4. Mutaciones de las N-Glicosilación en la HA del subtipo A/H3N2	30
Figura 5. Análisis Filogenético región de la HA del subtipo A/H3N2.....	32
Figura 6. Evolución molecular del Virus de Influenza región H3-Ecuador 2015-2022.	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de clados/subclados por año del subtipo H3, Ecuador 2015 - 2022	21
Tabla 2. Diferencia de aminoácidos entre las cepas vacunales y los clados de la región de la Hemagglutina Ecuador	24
Tabla 3. Diferencia entre sitios de glicosilación de cepas vacunales y clados región HA Ecuador	28
Tabla 4. Análisis comparativo de aminoácidos entre secuencias de Ecuador 2022 con respecto a A/Darwin/9/2021 NH.2022-2023/SH.2022	35

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Diferencia de aminoácidos entre las cepas vacunales y los clados de la región de la Hemaglutinina Ecuador	42
Anexo 2. Diferencia entre sitios de glicosilación de cepas vacunales y clados región HA Ecuador	48
Anexo 3. Script para realizar gráfico Muller Plot en R	54

1. DATOS GENERALES

1.1 Título del Proyecto: Variabilidad Genética de la Región de la Hemaglutinina del Virus de Influenza H3 en el Ecuador 2015-2020

1.2 Autor: Mgs. Alfredo Bruno

1.3 Director: PhD. Jesús Abraham Avelar Rivas

1.4 Datos de la Institución: Pontificia Universidad Católica del Ecuador – (PUCE)

2. RESUMEN

Antecedentes: Los virus de Influenza cada año ocasionan entre 291.000 y 645.000 muertes a nivel mundial y los casos de Influenza asociados a fallecimientos son generalmente más elevados los años con predominio de circulación de A(H3N2). Este subtipo tiene una alta variabilidad genética que genera una constante evolución dentro de los linajes a lo largo del tiempo y el remplazo periódico de clados circulantes en los países. Por este motivo, se requiere una vigilancia genómica, así como una actualización y revisión anual de la formulación de la vacuna.

Métodos: El objetivo general de la presente investigación es analizar la variabilidad genética de la región hemaglutinina del subtipo de Influenza H3 en el Ecuador. Para esto, el primer paso fue seleccionar secuencias genéticas del virus procedentes de Ecuador a partir de la base de datos GISAID que fueron alineadas mediante el uso de herramientas de bioinformáticas como el *MEGA XI*, *Bioedit* y *Nextclade*. Con el fin de estudiar la variabilidad, así como las relaciones filogenéticas entre los virus de Influenza H3N2 identificados, se utilizó el programa *MEGA 11* y *Nextstrain*. Para describir la historia evolutiva del árbol filogenético se seleccionó el método de *Neighbor-Joining* y las herramientas utilizadas para establecer las diferencias de residuos de aminoácidos fueron los programas, *AA dif* y *Count GS*; los análisis estadísticos, figuras y manejo de base de datos fueron realizados mediante los programas de Microsoft Excel, R Studio y Matlab.

Resultados: Entre las secuencias analizadas de Ecuador existió una alta variabilidad genética del subtipo H3 y co-circulación de varios clados/subclados en el período comprendido del 2015 al 2019 lo que podría afectar en el nivel de concordancia de clados circulantes en el país y el clado de la cepa vacunal recomendada. Sin embargo, entre los años 2021 y 2022, la proceso de diversidad genética fue menor y la mayoría de secuencias pertenecían principalmente a un subclado genético el 3C.2a1b.2a.2. Esto probablemente ocurrió debido a la la pandemia del

COVID-19 y las medidas de contención que limitaban la transmisión del virus. La presencia de un solo subclado predominante en los años 2021 - 2022, pudo favorecer las estrategias de prevención, considerando que la vacuna y los clados genéticos del virus del Ecuador se encontraban genéticamente relacionados.

SUMMARY

Background: Influenza viruses each year cause between 291,000 and 645,000 deaths worldwide. Cases of Influenza associated with deaths are generally higher in years with predominant circulation of A(H3N2). This subtype has a high genetic variability that underlies constant evolution within the lineages over time and the periodic replacement of circulating clades in the countries. For this reason, genomic surveillance is required, as well as an annual update and revision of the vaccine formulation.

Methods: The general objective of this research is analyzing the genetic variability of the hemagglutinin region of the Influenza H3 subtype in Ecuador. The first step was to select genetic sequences of the virus from Ecuador from the GISAID database and align them using MEGA XI, Bioedit and Nextclade. In order to study the variability as well as the phylogenetic relationships among the identified H3N2 Influenza viruses, the MEGA 11 and Nextrain programs were used. To describe the evolutionary history of the phylogenetic tree, the Neighbor-Joining method was selected. The tools used to establish the differences in amino acid residues were the AA dif and Count GS programs. Statistical analysis, figures and database management were carried out using Microsoft Excel, R Studio and Matlab programs.

Results: Among the analyzed sequences from Ecuador, there was a high genetic variability of the H3 subtype and co-circulation of several clades/subclades in the period from 2015 to 2019, which could affect the level of concordance of circulating clades in the country and the clade of the recommended vaccine strain. However, between the years 2021 and 2022, the process of genetic diversity was lower and most sequences belonged mainly to a genetic subclade 3C.2 a1b.2a.2, probably due to the presence of the COVID-19 pandemic and the containment measures that limited the transmission of the virus. The presence of a single predominant subclade in the years 2021 - 2022 could favor prevention strategies, considering that the vaccine and the genetic clades of the Ecuador virus were genetically related.

3. DESCRIPCION DETALLADA DE LA PROPUESTA

3.1 Justificación

Los virus de Influenza cada año ocasionan casos severos de la enfermedad, según Iuliano et al., 2018, causan entre 291.000 y 645.000 muertes a nivel mundial: los casos de Influenza asociados a fallecimientos son generalmente más elevados cuando existen años con predominio de circulación del subtipo A H3N2 (Kang et al., 2022; Jester et al., 2020). El virus de Influenza presenta característicos cambios en su estructura biológica denominados: deriva antigénica o cambios *drift*, estos ocurren anualmente, son los responsables de la necesidad de vacunarse anualmente y el salto antigénico o cambios *shift*, que pueden dar lugar a cambios en las proteínas de superficie del virus, hemaglutinina y neuraminidasa (NA), que originan las grandes pandemias y epidemias (Ferguson et al., 2003).

Las pandemias de Influenza son producidas principalmente por la capacidad del virus de reordenarse genéticamente entre cepas de origen humano y animal, lo que podría provocar la emergencia de un nuevo subtipo de influenza A circulante en humanos (Ferguson et al., 2003). Los nuevos subtipos, clados o subclados tienen el potencial de generar serios impactos en salud pública con devastadoras consecuencias en las poblaciones, por lo cual es fundamental realizar el análisis y seguimiento a nivel molecular mediante estudios de variabilidad genética que sirven como apoyo a la Vigilancia Epidemiológica desde una perspectiva molecular. El seguimiento epidemiológico a nivel genómico facilita el conocimiento de la composición y dinámica de transmisión del virus, esta información será un insumo para la toma de decisiones por parte de las autoridades nacionales de salud.

En la actualidad las herramientas de biología computacional han tenido un crecimiento exponencial a nivel global. Muchos programas se encuentran disponibles de manera gratuita y son capaces de ser utilizados por personas con poco conocimiento en bioinformática. Estas herramientas son de gran ayuda en el campo de la salud pública para realizar estudios de brotes, epidemias, pandemias, a través de análisis genómicos a gran escala capaces de procesar e informar datos en tiempo real. (Genomic Sequencing of SARS-CoV-2 a Guide to Implementation for Maximum Impact on Public Health, 2021).

Esto es de importancia en el caso de organismos que evolucionan rápidamente considerando que los genomas pueden revelar su diseminación espacio temporal detallada, y sus

respectivos análisis filogenéticos son particularmente útiles para comprender la epidemiología de patógenos. De esta manera, se puede caracterizar su comportamiento para estar prevenidos en futuras eventos de importancia en salud pública o nuevas variantes que puedan presentarse. así como determinar su nivel de propagación y evolución, especialmente en escenarios de brotes o pandemias. (Genomic Sequencing of SARS-CoV-2 a Guide to Implementation for Maximum Impact on Public Health, 2021).

Los objetivos de la presente investigación permitirán caracterizar la variabilidad genética de Influenza H3 en el Ecuador; analizar los clados circulantes en el país; comparar la composición del genotipo presente en la vacuna del subtipo H3, considerando que la vacunación anual es una de las principales estrategias de prevención de la enfermedad, esta información permitirá el fortalecimiento de la epidemiología molecular, complementar el conocimiento del comportamiento genético del virus contribuyendo a la respuesta a brotes o epidemias del virus de Influenza en el País.

3.2 Planteamiento del Problema:

Problema Principal: ¿Cuál es la variabilidad genética de la región Hemaglutinina del Subtipo de Influenza H3 en el Ecuador?

Problemas secundarios:

1. Cuáles son los clados genéticos predominantes del subtipo de Influenza H3 en el Ecuador
- 2.Cuál es la relación evolutiva entre los virus de Influenza H3
3. Qué tipo de mutaciones y en qué regiones de la hemaglutinina han circulado.

3.3 Contextualización del tema

La Hemaglutinina de los virus de Influenza contiene sitios antigénicos que son reconocidos por el sistema inmunológico del huésped, sitios de escisión cortados por proteasas, sitios de unión al receptor que reconocen a los receptores de ácido siálico en la membrana celular y péptidos que median la fusión durante el ingreso del virus a la célula, lo que hace importante el estudio a nivel molecular de esta región con fines de salud pública.

El cambio o mutaciones en la región HA puede incidir en el potencial de infección del virus, los mecanismos de evasión de la respuesta inmune natural o adquirida, así como la propagación entre huéspedes, sin embargo, actualmente existe muy poca información disponible o reportada referente a la evolución de la hemaglutina, sus cambios genéticos y los clados del virus que circulan en el Ecuador.

Considerando la capacidad biológica del virus de reordenarse genéticamente, y de originar nuevos tipos o subtipos con potencial pandémico o epidémico, es necesario caracterizar la evolución molecular de la región de la hemaglutinina del virus de Influenza H3. Este subtipo de virus evoluciona con mayor rapidez que los otros subtipos de Influenza, incluso entre especies. (Trovão et al., 2022). Este proyecto permitirá generar información de la circulación genética del virus de Influenza H3 y de esta manera complementar los datos disponibles en el Ministerio de Salud Pública (MSP).

Otro motivo fundamental para la elección del tema es la comparación de la cepa vacunal frente a los grupos genéticos que se identifiquen en Ecuador del subtipo H3. La OMS realiza reuniones bianuales para la elaboración de la vacuna, una formulación para el hemisferio norte, el cual se caracteriza por una circulación viral entre los meses de octubre del año anterior hasta abril del año siguiente y otra formulación para el hemisferio sur, el cual cuenta con una circulación aproximadamente entre los meses de mayo a septiembre. (Caini et al., 2016, 2018) y (Durand et al., 2016).

A diferencia de otros países, en el Ecuador al ser un país tropical, presenta dos periodos de circulación para el virus de influenza, que comprenden los meses de diciembre-enero y un pico secundario durante los meses de julio y agosto; (Caini et al., 2016, 2018) y (Durand et al., 2016), estas consideraciones epidemiológicas sumadas a la ubicación geográfica del país en la línea ecuatorial, hace que reciba influencias climatológicas del hemisferio norte y del hemisferio sur, estas características ecológicas, período de circulación viral, pueden afectar el comportamiento epidemiológico del virus y por ende a las principales estrategias de prevención como es la vacunación al momento de decidir que formulación de la vacuna se debe aplicar para el país. Uno de los factores que permiten tomar decisiones es poder identificar los clados circulantes del virus, por tal motivo, es fundamental realizar análisis genéticos que permitan identificarlos y de esta manera contribuir con información científica relevante con la finalidad de evaluar la formulación de la vacuna es más apropiada utilizar.

La relación entre la vacuna y los genotipos del virus, se puede realizar mediante la aplicación

de tecnologías como el uso de herramientas bioinformáticas cada vez más eficientes, a menor costo y varias de estas se encuentran disponibles de manera gratuita *on-line* para análisis automatizados, colaborando esencialmente a los sistemas de salud que buscan alternativas más eficaces para mitigar la enfermedad y de esta manera poder responder a estas preguntas biológicas.

Al final del proyecto, se pretende contar con resultados que puedan ser utilizados como insumo con la finalidad de establecer estrategias de prevención frente a futuros brotes, epidemias o pandemias por parte de las Autoridades Nacionales de Salud.

3.4 Objetivos:

3.4.1 Objetivo general

- Analizar la Variabilidad Genética de la Región HA del subtipo de Influenza H3 en el Ecuador

3.4.2. Objetivos específicos

- Determinar las principales clados genéticos del virus de Influenza H3 en el Ecuador
- Establecer la relación evolutiva entre los virus de Influenza H3
- Realizar análisis filogenético de la región de la Hemaglutinina entre los virus de Influenza H3.
- Comparar las secuencias obtenidas a partir de cepas ecuatorianas de referencia de la región.

3.5 Marco Teórico

3.5.1. Antecedentes o marco referencial

La Influenza es una de las principales causas de mortalidad en las poblaciones y uno de los principales patógenos con capacidad de originar nuevas epidemias o pandemias debido a sus características como el reordenamiento genético sobre todo en sus glicoproteínas de superficie. La hemaglutinina (HA) es la principal glicoproteína de superficie de los virus de la

gripe, la cual es sometido a una fuerte presión por selección por parte del sistema inmunitario, al ser el principal objetivo de los anticuerpos y contar con una alta variabilidad genética, razón por la cual es la región utilizada para caracterizar las variantes genéticas del virus. (Trovão et al., 2022).

Desde el punto de vista epidemiológico, los casos de Influenza asociados a fallecimientos son generalmente más elevados durante los años con predominio del subtipo A(H3N2) circulante, (Kang et al., 2022), (Jester et al., 2020). Según estudios previos los virus de Influenza H3 cambian más rápidamente que los virus de H1 y que los virus de Influenza B. En el país existe una vigilancia de infecciones respiratorias agudas graves llevada a cabo por el Ministerio de Salud Pública, sin embargo, debido a la premura de la entrega de resultados, la alta carga de trabajo de los laboratorios de salud pública, falta de tecnología, herramientas de biología computacional, entre otras causas, no han permitido implementar una vigilancia genómica para la caracterización de los virus de Influenza en especial del subtipo H3, por ende existe un desconocimiento en el Ecuador en cuanto a los clados que han estado circulando y si estas variantes se encuentran relacionadas genéticamente con los virus identificados en otros países de la región de Sudamérica y con la formulación de la vacuna recomendada por la OMS a los estados miembros.

3.5.2. Marco teórico

La influenza es una enfermedad respiratoria que infecta anualmente entre el 5-15 % de la población mundial. Informes recientes estiman que anualmente estas infecciones provocan entre 291.000 y 645.000 muertes en todo el mundo y los casos de Influenza asociados a fallecimientos, son generalmente más elevados en los años con predominio de circulación del subtipo A(H3N2) (Iuliano et al, 2018). La hemaglutinina es la glicoproteína de superficie de los virus de la gripe, la cual es sometida a una fuerte presión por selección por parte del sistema inmunitario al ser el principal objetivo de los anticuerpos. Según estudios previos, los virus de Influenza H3 cambian más rápidamente que los virus de H1 y que los virus de Influenza B. (Fergusson, 2003).

Las pandemias de Influenza son originadas por esta capacidad del virus de reordenarse genéticamente entre virus de origen humano y animal, para lo cual la mayoría de personas no cuenta con la respuesta inmune necesaria para inhibir el contagio y esto origina una rápida diseminación en la población con serias consecuencias en la salud pública. Entre las principales pandemias podemos mencionar a la gripe rusa en 1889-1890 originada el subtipo

H3N8; la gripe Española en 1918 por el subtipo H1N1 que causo más fallecidos que la primera guerra mundial; la gripe Asiática en 1957-1958 por el subtipo H2N2 de procedencia aviar; la gripe de Hong Kong en 1968 por el H3N2; y la primera pandemia del nuevo milenio causada por el H1N1 pdm. Por tal motivo, la OMS diseña vacuna cada año. Los nuevos virus de la Influenza A circulan entre animales y representan gran amenaza debido a la capacidad de propagación rápida y convertirse en pandemia, como lo ha sido la pandemia por COVID-19. (Castañeda, 2021)

Las enfermedades asociadas a la influenza resultan en una alta morbilidad y mortalidad en las Américas, (Uyeki et al., 2022). Estos efectos se pueden mitigar con una campaña de vacunación antigripal adecuadamente elegida y programada. Para brindar mayor orientación en la elección de la formulación de vacuna y el momento de administración más oportuno, hay que tener en cuenta que la evolución constante de los virus de la influenza en especial del subtipo H3 urge a los países a reportar datos de vigilancia de alta calidad y en tiempo real, específicamente datos de secuencias genéticas, que permita la toma de decisiones de salud sobre las estrategias de prevención, mitigación y selección de la formulación más apropiada de la vacuna de Influenza para el país.

Los Centros Nacionales de Influenza perteneciente a los Laboratorios Nacionales de Referencia de 107 países miembros de la OMS reportaron para el período del 30 de mayo al 12 de junio del 2022 la siguiente información: Se analizaron más de 161.959 muestras, de las cuales 9069 resultaron positivos a Influenza, 8839 que corresponden al 97,5% fueron tipificados como influenza A y 230 (2,5%) como influenza B. De los virus influenza A subtipificados, 97 (2,3%) fueron influenza A(H1N1) pdm09 y el mayor subtipo circulante a nivel global es el subtipo H3 con 4203 (97,7%). De los virus B caracterizados, 3 (6,5%) pertenecían al linaje B-Yamagata y 43 (93,5%) al linaje B-Victoria. (WHO. 2022)

Como en muchos problemas de salud pública originados por patógenos emergentes y reemergentes, es necesario cortar las vías de transmisión y procurar disminuir estas cifras, En el caso de Influenza, la mejor forma de prevenir es mediante la vacunación. Los datos de los CDC desde el 4 de octubre de 2021 hasta el 30 de abril de 2022, mostraron que las vacunas contra la influenza redujeron el riesgo de las personas de contraer una influenza grave causada por los virus de la influenza H3N2, y los otros virus de la influenza más comunes esta temporada, en un 35 % en general. (CDC, 2022)

Las estimaciones de efectividad de la vacuna de principios de temporada de los Centros para el Control y Prevención de enfermedades de EEUU (CDC) publicadas en marzo no fueron estadísticamente significativas, lo que sugiere que la vacunación no ofreció ningún beneficio en la reducción del riesgo de enfermedad gripal. Los primeros datos subestimaron qué tan bien funcionaron las vacunas contra la influenza durante la temporada de influenza 2021-2022 debido al pequeño tamaño de la muestra y los sesgos debido al COVID-19. Desde entonces, se dispone de más datos sobre la gripe y los CDC han corregido el sesgo de COVID-19 al excluir a los pacientes con la enfermedad de COVID-19 del grupo de comparación. (CDC, 2022)

La selección de componentes para la vacuna del Hemisferio Norte ocurre durante el mes de febrero y del Hemisferio Sur ocurre durante septiembre, cuando los expertos de la OMS y los países miembros examinan los datos de vigilancia y determinan que cepas se anticipan a la siguiente temporada. (WHO, 2014). Por lo general, las vacunas del hemisferio norte se encuentran disponibles en los países entre los meses de octubre - noviembre y las vacunas del hemisferio sur están disponibles entre finales de marzo y principios de abril.

Con la excepción de Guatemala, Jamaica y la zona tropical de México, los países del trópico americano deben considerar los posibles beneficios de vacunarse con las formulaciones establecida para el hemisferio sur a principios de abril para brindar protección contra la actividad gripal anticipada durante abril-septiembre. Incluso países con dos epidemias anuales de influenza en algunas o todas sus provincias p. ej., Brasil y Ecuador (Mello WA, 2009), deben considerar el efecto de aumentar la cobertura de vacunación entre las poblaciones objetivo durante la principal epidemia de influenza en abril-septiembre antes de invertir en una segunda campaña de vacunación durante octubre - noviembre. Esto, considerando que los países tropicales reciben influencias climatológicas de ambos hemisferios, lo que dificulta la descripción del comportamiento virológico en esta región.

La actividad de la influenza estacional en climas tropicales como en el Ecuador se comprende poco y esta menos definida. Sin embargo, se han identificado múltiples picos y actividad durante todo el año que frecuentemente coinciden con la temporada de lluvias (Bloom-Feshbach et al. 2003, Viboud et al., 2006). Específicamente, se han descrito dos picos anuales de circulación de influenza entre los meses de enero y agosto, lo que hace necesario la investigación constante de los subtipos y su evolución molecular para conocer mejor su comportamiento en el país y su nivel de similitud con las cepas de referencias utilizadas en las formulaciones anuales recomendadas para la región y así permitir a las autoridades sanitarias

nacionales el correcto juicio y toma de decisiones con base en información científica sustentable. (Caini et al., 2016, 2018, Durand et al., 2016).

Para describir la variabilidad genética del virus de Influenza H3, se analiza la región de la hemaglutinina por ser una de las glicoproteínas de superficie que permite el ingreso del virus al huésped. según estudio realizado por Leite et al, 2020, mostró que la mayoría de secuencias del estudio pertenecían a los grupos genéticos HA 3C.2a (n=586) y 3C.3a (n=50). Entre los virus del clado 3C.2a, la mayoría (n= 530) se agruparon en los subclados 3C.2a2 (n=352) y 3C.2a1 y sus subclados (n=178). Dentro del grupo genético 3C.2a1, la mayoría de secuencias pertenecían al subclado 3C.2a1b definido por las sustituciones de aminoácidos N171K, I406V, G484E. Todas las secuencias en el subclado 3C.2a1b/135K se recopilaron durante 2018 y se agruparon en un subclado más pequeño que comparte una sustitución de aminoácido T128A en HA1 que conduce a la pérdida de un motivo de glicosilación. (Leite et al., 2020)

Como se puede observar en estos estudios, los análisis de las secuencias genéticas y los metadatos conexos sirven de apoyo a la respuesta y estrategias de control de los agentes infecciosos, facilita el seguimiento de la propagación geográfica - temporal, la pronta detección, así como, evaluación de mutaciones que puedan influir en la capacidad patogénica, transmisión del virus, o en medidas de respuesta adoptadas como las medidas no farmacológicas, vacunas, el tratamiento y las pruebas diagnósticas. (de Mora et al., 2022; WHO. 2022)

El Ecuador cuenta con una vigilancia integrada de Influenza y otros Virus Respiratorios enfocada en la caracterización de las muestras a través de técnicas de biología molecular para la identificación de tipos y subtipos del virus de Influenza. Sin embargo, existen muy pocos análisis de los clados circulantes debido a las obligaciones propias de los sistemas de vigilancia, la alta carga de trabajo de los laboratorios de salud pública y a que la gran cantidad de datos disponibles que supera en muchas ocasiones la capacidad de análisis. También hacen falta análisis sobre la evolución molecular de los subtipos circulantes en el país que serían de gran importancia para realizar estrategias de detección y manejo de brotes de enfermedades infecciosas. Este trabajo busca describir los virus de la Influenza circulantes en el Ecuador mediante análisis de filogenética y de su diversidad molecular con miras a contribuir al desarrollo de pruebas diagnósticas, medicamentos, vacunas, y en general para mejorar a la respuesta sanitaria en el contexto integral de las enfermedades emergentes y reemergentes de importancia en salud pública.

3.6 Metodología

Con el fin de estudiar la variabilidad, así como las relaciones filogenéticas entre los virus de Influenza H3N2 identificados y las cepas vacunales incluidas durante los años de estudio, se seleccionó la base de datos especializados para el virus de Influenza y de acceso público denominada GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data), en las cuales se consideraron secuencias genéticas ecuatorianas del virus disponible en esta plataforma de datos genéticos.

Se compararon secuencias ecuatorianas del gen HA del subtipo H3 dentro del período de estudio obtenidas desde el 2015. El análisis y alineación se realizó mediante el uso de las siguientes herramientas de bioinformáticas: software *MEGA 11*, *Bioedit* y *Nextclade* que permiten el alineamiento múltiple de secuencias.

Se desarrolló un árbol filogenético mediante el uso del programa *MEGA 11*, y el uso de la herramienta online disponible de manera gratuita *Nextstrain*. Para describir la historia evolutiva con un árbol filogenético se seleccionó el método de *Neighbor-Joining*, el cual es el más popular en la construcción de árboles para a partir de mediciones de distancias genéticas de secuencias vecinos que minimizan secuencialmente el tamaño total del árbol. (Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021).

Es importante mencionar que es uno de los algoritmos más utilizados, considerando que es un método simple, muy rápido para cálculo de distancias de mínima evolución y capaz de analizar grandes cantidades de secuencias en poco tiempo y sin uso de muchos recursos computacionales. Para poder establecer las diferencias de residuos de aminoácidos se utilizaron los programas, AA dif y Count GS; para análisis estadísticos y base de datos se utilizó Microsoft Excel, R Studio y Matlab. (Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021)

3.7 Limitaciones del estudio

La principal limitación del estudio, es que en el Ecuador no cuenta con suficientes secuencias genéticas disponibles para realizar una comparación más robusta de clados circulantes, sin embargo, con los datos aquí presentados se puede estimar el comportamiento del virus en el Ecuador con secuencias disponibles durante los años de estudio.

Durante el año 2020, debido a la emergencia ocasionada por la pandemia del SARS CoV-2 a nivel mundial, no se detectó presencia del virus H3 en el Ecuador al igual que en la mayoría de países y sistemas de vigilancia de virus respiratorios a nivel global, sin embargo, se decidió

incluir datos del período 2021-2022, en conjunto con los datos existentes de años anteriores con la finalidad de fortalecer y complementar los análisis realizados.

En la presente investigación se encuentra enfocada en la región de la HA, considerando que es la principal glicoproteína utilizada para determinar la variabilidad genética del virus, sin embargo, existen otras regiones del genoma viral como las regiones de la neuraminidasa; nucleoproteína; proteína de la matriz; regiones no estructurales; la región de la transcriptasa como la PB1, PB2, PA, que pueden ser relevantes para la respuesta inmune del huésped, tratamiento antiviral, ciclo de replicación, nivel de patogenicidad - letalidad, transporte de RNA celular, entre otras funciones específicas del virus que pueden ser utilizados para realizar otro tipo de estudios complementarios, sin que esto pueda afectar a los resultados analizados en la presente investigación.

Otra limitación importante es que los datos genómicos solo se generaron a partir de la captación de casos de pacientes hospitalizados. Esto implica que podría haber otros clados o subclados circulantes en pacientes con enfermedad respiratoria leve. Aunque escapa de los objetivos de este trabajo, con la finalidad de tener una visión completa, se sugiere continuar con futuros muestreos diseñados para capturar la diversidad genética entre portadores asintomáticos o a partir de casos ambulatorios.

4. RESULTADOS:

4.1 Identificación de clados por año

Se realizó la descarga de las secuencias genéticas de la plataforma GISAID del Virus de Influenza, región de la hemaglutinina del subtipo H3 teniendo un total de 80 secuencias de Ecuador.

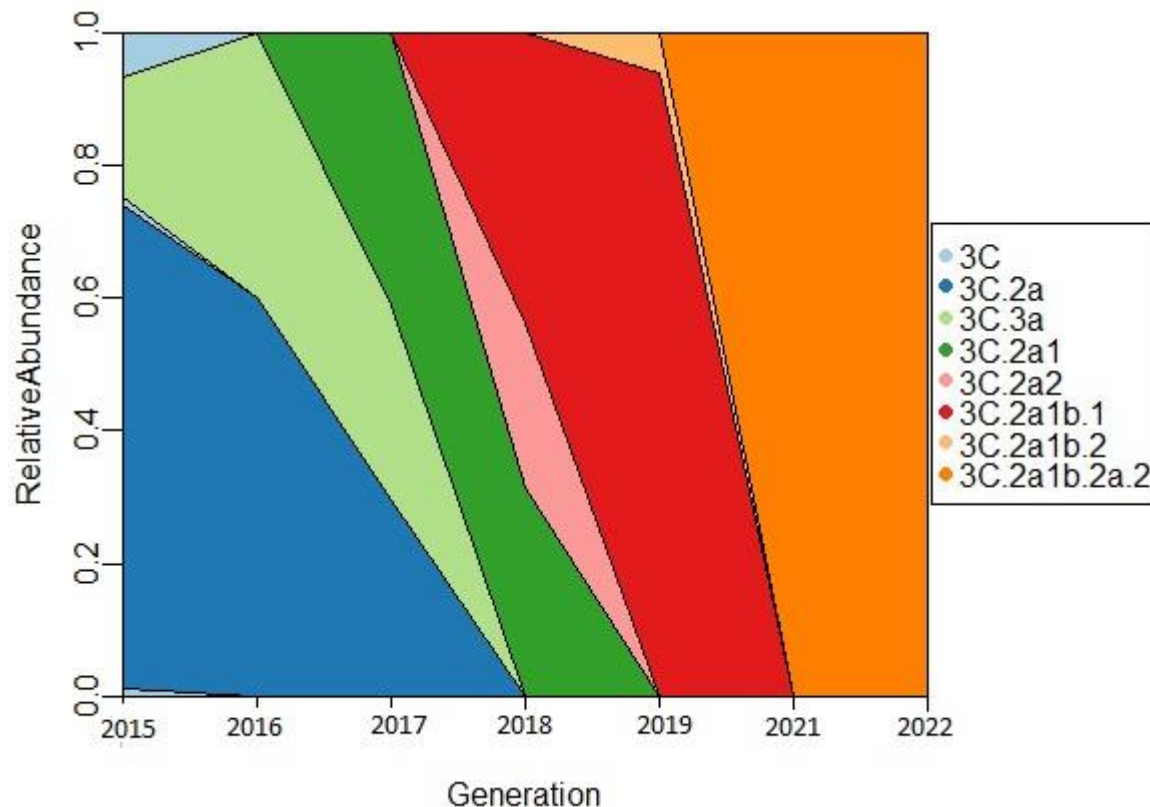
Estas secuencias fueron cargadas en Nextclade y se obtuvo la siguiente tabla de distribución de clados por año:

Tabla 1. Distribución de clados/subclados por año del subtipo H3, Ecuador 2015 - 2022

Año	3C	3C.2a	3C.3a	3C.2a1	3C.2a1b.1	3C.2a2	3C.2a1b.2
2015	1	8	2	0	0	0	0
2016	0	3	2	0	0	0	0
2017	0	5	5	7	0	0	0
2018	0	0	0	1	7	4	0
2019	0	0	0	0	15	0	1
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	0	0	0	0	0	0	14
2022	0	0	0	0	0	0	5
TOTAL	1	16	9	8	22	4	20

Fuente: Alfredo Bruno, 2022

Figura 1. Distribución de clados/subclados por año del subtipo H3, Ecuador 2015 - 2022



Fuente: Alfredo Bruno, 2022

En la figura 1, se puede observar la distribución de clados y subclados del subtipo H3, utilizando la región de la hemaglutinina durante el período de estudio del 2015 al 2022, identificadas en secuencias ecuatorianas. En el eje de las x se encuentran detallados los años; sobre el eje de las y se encuentra la abundancia, utilizando la frecuencia de casos detectados por cada uno de los años del estudio. Los colores de la figura indican cada uno de los clados y subclados identificados.

El clado 3C (celeste), que dio origen posteriormente a la división de cada uno de los subclados que posteriormente circularon en el país. El clado 3C, se lo identificó exclusivamente en el año 2015 y posteriormente dejó de circular, evolucionando en los siguientes subclados. El subclado 3C.2a que circuló por 3 años consecutivos, siendo predominante en los años 2015, 2016 y que continuó circulando en el 2017 (Figura 1, azul). En el 2015 además de los clados y subclados 3C y 3C.2a también co-circuló 3C.3a (Figura 1, verde claro), el mismo que permaneció en circulación hasta el año 2017. Finalmente, el subclado 3C.2a1b.2 fue detectado por primera vez en el año 2019 (Figura 1, naranja).

En el año 2017 emergió un nuevo subclado denominado 3C.2a1 (Figura 1, verde oscuro). este subclado continuó circulando en menor proporción hasta el siguiente año. En el año 2018 se encontró al subclado 3C.2a2, el mismo que tuvo un período muy corto de circulación, ya que solamente fue identificado en el año 2018 (Figura 1, rosado).

El subclado predominante en el año 2018, 2019, 2021 y 2022, fue el 3C.2a1b.1, (Figura 1, rojo). Durante los primeros 3 años del estudio (entre el 2017 al 2019) existía una co-circulación de más de un clado/subclado, sin embargo, desde el año 2021 se presentó un predominio del subclado 3C.2a1b.2

La presencia de nuevos clados genéticos circulantes, es debido al proceso normal de evolución viral, procesos de presión por selección y se presenta con frecuencia en los virus de Influenza mediante los cambios antigénicos menores, deriva antigénica o cambios *drift* y los saltos antigénicos mayores o cambios *shift*, los cuales pueden causar mutaciones en las glicoproteínas de superficie hemaglutinina o neuraminidasa, por este motivo probablemente los clados identificados en la presente investigación, no han persistido a través del tiempo por más de 3 años, sin embargo, desde el año 2021 se ha detectado la circulación de solo un subclado (3C.2a1b.2), sin que exista co-circulación con otros subclados, lo cual permitiría una mejor respuesta en salud pública, en cuanto a la principal medidas de prevención como es la vacunación, al no contar con una alta diversidad genética del subtipo H3 en los años 2021 - 2022.

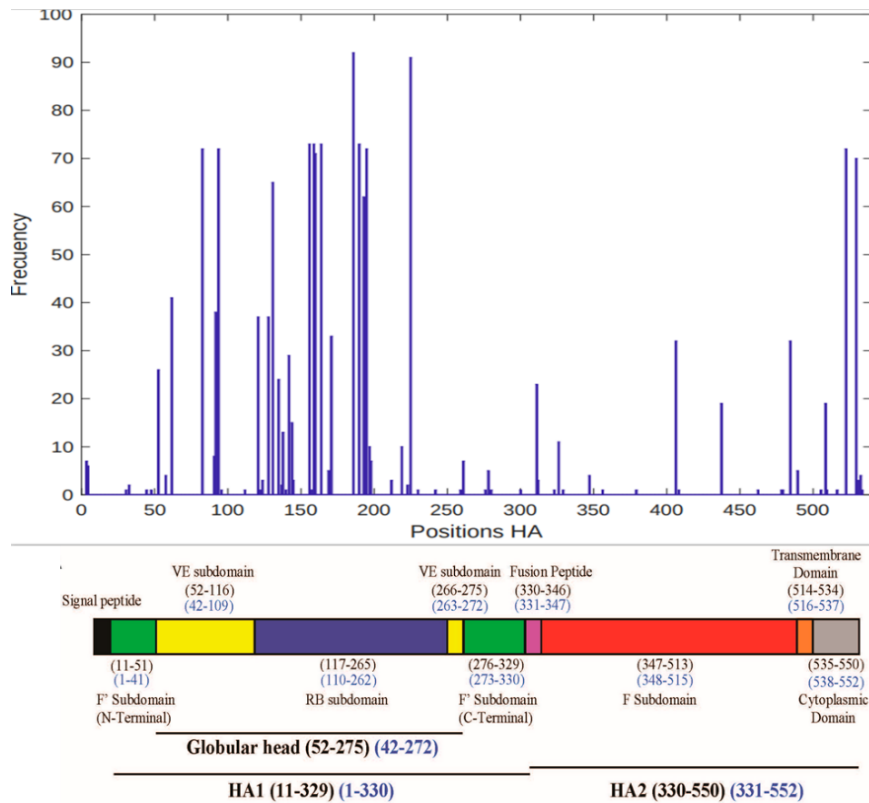
4.2.- Evolución molecular de clados

Se utilizó el programa *AA dif* con la finalidad de generar una tabla de cambios de aminoácidos, *AA dif* utiliza como archivo de entrada, la secuencia fasta alineada y emite un archivo de salida en formato csv, en el cual, podemos observar las diferencias de aminoácidos entre las secuencias analizadas. La siguiente herramienta fue el programa *Count GS* para determinar el número y posición de los sitios de glicosilación, considerando que los patrones de glicosilación pueden influir en la antigenicidad o patogenicidad viral. El programa utiliza como archivo de entrada, la secuencia fasta alineada y emite un archivo de salida en formato csv, con una tabla de descripción de sitios identificados. Los usos de estos programas permitieron profundizar en el conocimiento de la evolución del virus a través del tiempo en el Ecuador, al identificar estos cambios a nivel de aminoácidos van ocurriendo (apareciendo o eliminándose) a través del tiempo y de esta manera poder estimar su mecanismo de adaptación al huésped o sus mecanismos de evasión del sistema inmune que están expuestos a través de la respuesta inmunológica del huésped y otros procesos de presión por selección viral.

Tabla 2. Diferencia de aminoácidos entre las cepas vacunales y los clados de la región de la Hemaglutinina Ecuador

Isolate	#	Positions Different
A/DARWIN/9/2021 NH.2022-2023/SH.2022_12GS		
A/CAMBODIA/E0836360/2020 NH.2021-2022_12GS	9	156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 198, 225
A/HONG KONG/2671/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH.2020_10GS	17	83, 94, 128, 131, 135, 137, 138, 156, 159, 164, 186, 190, 195, 219, 225, 522, 529
A/KANSAS/14/2017 DEC F WF1 3A HA NH.2019-2020_11GS	25	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 225, 326, 406, 478, 484, 522, 529
VIDL A/SOUTH AUSTRALIA/34/2019 FEB WF1 2A B 131K HA SH.2019_13GS	14	83, 94, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 347, 522
A/SINGAPORE/JN1M1H-16-0019/2016 NH.2018-2019/SH.2018/SH.2017_12GS	18	62, 83, 92, 94, 131, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 194, 195, 311, 479, 522, 529
A/SWITZERLAND/8060/2017 DEC WF1 2A J HA SH.2018EGG_13GS	23	62, 83, 92, 94, 96, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529
A/HONG KONG/4801/2014 FEB F WF1 2A HA NH.2017-2018/NH.2016-2017/SH.2016/SH.2015_13GS	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
A/SWITZERLAND/9715293/2013 DEC F WF1 3A HA NH.2015-2016/SH.2014_12GS	26	3, 62, 83, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 326, 406, 484, 489, 522, 529
A/TEXAS/50/2012 APR E WF1 ROOT HA NH.2014-2015/NH.2013-2014_12GS	28	3, 62, 83, 92, 94, 121, 128, 131, 142, 144, 145, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 198, 219, 225, 406, 484, 489, 522, 529
A/HONGKONG/45/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH.2020_CELL_11GS	18	83, 94, 128, 131, 135, 137, 138, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 195, 225, 312, 522, 529
A/PERTH/10/2010 NH.2013/SH.2010_12GS	36	3, 33, 45, 48, 53, 62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 144, 145, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 198, 219, 223, 225, 230, 278, 280, 312, 406, 484, 489, 522, 529
A/VICTORIA/361/2011 NH.2012-2013/SH.2012_13GS	27	3, 33, 62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 144, 145, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 278, 406, 484, 489, 522, 529
H3 HA ECUADOR/BARRA/ 628769 2019-12-27	19	31, 83, 94, 128, 131, 135, 140, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 505, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 402491 2019-11-23	14	83, 94, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 347, 522
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 357824 2019-01-15	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355743 2018-12-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355742 2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355741 2018-11-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355740 2018-12-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355739 2018-12-26	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355738 2018-12-07	17	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 223, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355737 2019-01-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355736 2019-01-03	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355735 2018-12-27	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 353709 2019-01-11	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 353708 2019-01-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 349956 2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 349898 2019-01-14	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 347931 2019-01-12	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347930 2019-01-03	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 347936 2019-01-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347935 2019-01-13	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 347933 2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347929 2018-12-16	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347927 2019-01-16	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 320332 2018-03-16	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320331 2018-05-26	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320330 2018-04-21	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320329 2018-03-20	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299991 2018-01-09	22	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299890 2017-12-17	21	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 158, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 408, 516, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 277506 2017-02-26	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 277505 2017-03-28	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 275726 2017-03-07	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 242, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275725 2017-04-07	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275724 2017-04-13	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 259, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 273640 2017-04-23	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 323, 509, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272897 2017-03-05	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272896 2017-03-04	17	53, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272893 2017-01-27	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 312, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272892 2017-03-28	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272891 2017-02-25	26	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/NAPO/ 272890 2017-03-14	16	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/ORELLANA/ 272889 2017-03-25	26	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 272888 2017-03-21	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272886 2017-05-18	16	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272885 2017-03-22	17	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 329, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232989 2016-03-16	26	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 169, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 261, 276, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232988 2016-03-10	23	62, 83, 92, 94, 121, 124, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 232986 2016-04-21	23	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232553 2016-05-22	24	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 225, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232542 2016-05-21	24	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 225, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 201207 2015-06-01	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200684 2015-05-08	23	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200683 2015-02-05	31	3, 5, 62, 83, 92, 94, 112, 121, 122, 128, 131, 144, 156, 157, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 347, 406, 484, 489, 522, 529, 531, 534
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 200682 2015-06-29	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200681 2015-05-14	24	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200680 2015-05-21	26	62, 83, 92, 94, 121, 124, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 462, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 197496 2015-08-06	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 195876 2015-04-25	27	3, 62, 83, 92, 94, 121, 124, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 326, 347, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 194962 2015-06-06	24	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 194961 2015-02-18	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 194960 2015-06-05	26	3, 62, 83, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 300, 326, 406, 484, 522, 529
A/Ecuador/GUAYAS/9103/2022 2022-01-04 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/3916/2021 2021-12-22 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/1062/2021 2021-12-29 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9112/2022 2022-01-14 HA	6	53, 186, 225, 356, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9092/2021 2021-12-31 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/819/2021 2021-12-20 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/AZUAY/4287/2021 2021-11-26 HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9107/2022 2022-01-06 HA	6	53, 186, 225, 379, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9089/2021 2021-12-31 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/1130/2022 2022-01-07 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/3922/2021 2021-12-26 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9064/2021 2021-12-15 HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/827/2021 2021-12-31 HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9077/2021 2021-12-27 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9126/2022 2022-01-26 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/1064/2021 2021-12-30 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9078/2021 2021-12-27 HA	5	53

Figura 2. Diferencia de aminoácidos de la región de la Hemaglutinina que son diferentes entre las cepas vacunales y los clados circulantes en Ecuador 2015 - 2022



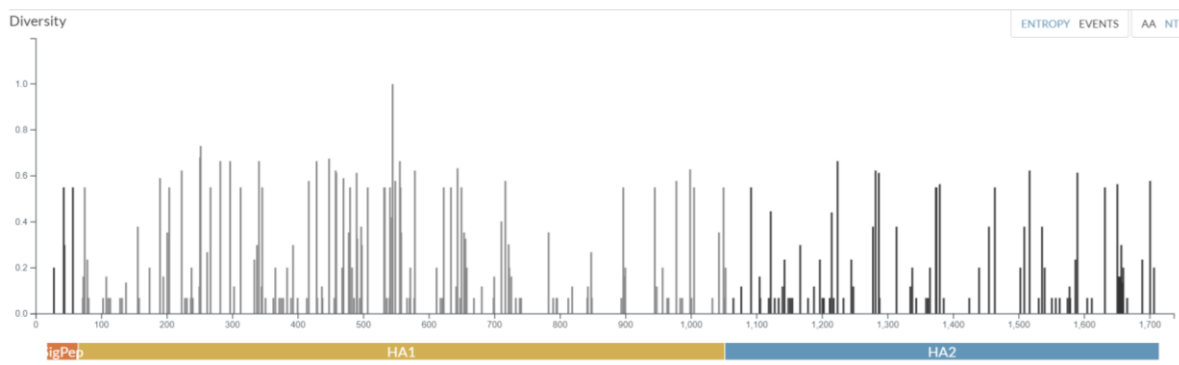
Fuente: Alfredo Bruno, 2022; Zheng et al., 2018

En la figura 2, se puede observar una comparación en cuanto a la diferencia de la ubicación de los aminoácidos en la región de la hemaglutinina que conforman la cepa recomendada por la OMS en la formulación del hemisferio sur 2023 del subtipo H3N2, (A/Darwin/9/2021) y las secuencias del virus de Influenza H3 identificadas procedentes de Ecuador durante el período del 2015 al 2022. En el eje de las x se puede observar la representación esquemática de la región de la glicoproteína de superficie hemaglutinina, obtenida de Zheng et al., 2018, la cual ocupa el 80 % de las proteínas expresadas en la superficie viral, esta glicoproteína es codificada por el segmento 4 del virus y como ilustra la figura, se encuentra conformado por aproximadamente 560 aminoácidos. Esta región participa en el reconocimiento del virus a los residuos de ácido siálico de la célula huésped y de esta manera permite el ingreso del virus, además de participar en el nivel de patogenicidad y es identificado por los anticuerpos neutralizantes como parte de la respuesta inmune específica producida por el huésped (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012).

Como se puede visualizar entre las regiones de la proteína se encuentran el péptido señal, (posición 11 a 51) subdominio de la esterasa vestigial (VE), ubicado entre la posición 52-116, y 266 a 275, subdominio de fusión (F) entre posición 11-51 y 276-329, subdominio de unión al receptor (posición 117-265), péptido fusión, (330 a 346) dominio transmembranal (514-534) y el dominio citoplasmático, (535-550), así como las zonas comprendidas por la cabeza globular (donde se encuentra el sitio de unión con el ácido siálico), va desde la posición 52 hasta a 275 y las regiones HA1 (desde la posición 11 a la 329) y HA2 (entre las posiciones 330-550).

En la figura 2, al comparar las secuencias de Influenza H3 del Ecuador desde el 2015 al 2022, la mayor cantidad de diferencia de aminoácidos entre las secuencias ecuatorianas y la cepa recomendada en la formulación de vacuna de la OMS para el hemisferio sur 2023, se encuentra ubicado principalmente en la cabeza globular de la región de la hemaglutinina (sitio de unión con el ácido siálico), debido posiblemente al mecanismo normal de respuesta y escape viral al sistema inmunológico, ya que es una área altamente inmunogénica. En los años 2021 y 2022 solo existen entre 5 y 6 cambios de aminoácidos con respecto a las secuencias de los años 2018 y 2019 que tienen entre 16 y 24 cambios de aminoácidos.

Figura 3. Diversidad de cambios de nucleótidos entre las secuencias ecuatorianas de la región de la Hemaglutinina del subtipo H3, 2015 - 2022.



Fuente: Alfredo Bruno 2022; Nextclade. <https://clades.nextstrain.org/tree, 2022>

En la figura 3 obtenido de Nextclade, 2022 (<https://clades.nextstrain.org/>). Se realizó el análisis de secuencias ecuatorianas en el período comprendido del 2015 al 2022. En el eje de las y, se encuentra el nivel de diversidad genética a través de una escala de 1 a 2. En el eje de las x, se puede evidenciar un esquema representativo de la secuencia completa de nucleótidos de la región de la hemaglutinina, identificando la región del péptido señal, la región HA1 y la región HA2. Se puede observar que la mayoría de cambios y mayor diversidad genética se presenta en la región HA1, según Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012, la HA1 facilita el

ingreso del virus al huésped, al unir los receptores que contienen el ácido siálico en la membrana celular, posteriormente a través del proceso de endocitosis mediada por el receptor y el pH del endosoma, induce un cambio conformacional de HA permitiendo el proceso de fusión para la liberación de ribonucleoproteínas al citoplasma y posterior ingreso en el núcleo celular para el proceso de transcripción y replicación viral. Esta subunidad HA1, lleva un sitio de unión al receptor y es responsable de la unión a cadenas específicas al ácido siálico en la superficie de la célula huésped. Los cambios en los residuos de aminoácidos en esta región pueden alterar la preferencia de unión del virus de Influenza por ende, es necesario un monitoreo constante a través de herramientas de biología computacional que permitan una mejor comprensión de la evolución y variación de la hemaglutinina en los sistemas de vigilancia genómica.

Tabla 3. Diferencia entre sitios de glicosilación de cepas vacunales y clados región HA Ecuador

Strain	#	8	22	38	45	63	122	126	133	144	158	165	246	285	483
A/DARWIN/9/2021 NH.2022-2023/SH.2022 12GS	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/CAMBODIA/E0826360/2020 NH.2021-2022 12GS	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/HONG KONG/2671/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH2020 10GS	10	X	X	X	X	X							X	X	X
A/KANSAS/14/2017 DEC F WF 3A HA NH.2019-2020 11GS	11	X	X	X	X	X			X				X	X	X
VIDRL A/SOUTH AUSTRALIA/34/2019 FEB WF 2A1B 131K HA SH.2019 13GS	13	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X
A/SINGAPORE/INFIMH-16-0019/2016 NH.2018-2019/SH.2018/SH.2017 12GS	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/SWITZERLAND/8060/2017 DEC WF 2A2 HA SH.2018EGG 13GS	13	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X
NG KONG/4801/2014 FEB F WF 2A HA NH.2017-2018/NH.2016-2017/SH.2016/SH.2015	13	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X
A/SWITZERLAND/9715293/2013 DEC F WF 3A HA NH.2015-2016/SH.2014 12GS	12	X	X	X	X	X			X	X			X	X	X
A/TEXAS/50/2012 APR E WF ROOT HA NH.2014-2015/NH.2013-2014 12GS	12	X	X	X	X	X			X	X			X	X	X
A/HONGKONG/45/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH.2020.CELL 11GS	11	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X
A/PERTH/10/2010 NH.2013/SH.2010 12GS	12	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
A/VICTORIA/361/2011 NH.2012-2013/SH.2012 13GS	13	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/IBARRA/ 628769 2019-12-27 11gs	11	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 402491 2019-11-23 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 357824 2019-01-15 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355743 2018-12-04 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355742 2019-01-10 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355741 2018-11-20 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355740 2018-12-20 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355739 2018-12-26 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355738 2018-12-07 10gs	10	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355737 2019-01-04 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355736 2019-01-03 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355735 2018-12-27 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 353709 2019-01-11 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 353708 2019-01-20 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 349956 2019-01-10 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 349898 2019-01-14 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 349761 2019-01-12 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347939 2019-01-03 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 347936 2019-01-04 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347935 2019-01-13 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 347933 2019-01-10 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347929 2018-12-16 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347927 2019-01-16 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 320332 2018-03-16 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320331 2018-05-26 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320330 2018-04-21 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320329 2018-03-20 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299991 2018-01-09 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299890 2017-12-17 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 277506 2017-02-26 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 277505 2017-03-28 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 275726 2017-03-07 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275725 2017-04-07 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275724 2017-04-13 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 273640 2017-04-23 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272897 2017-03-05 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272896 2017-03-04 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272893 2017-01-27 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272892 2017-03-28 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272891 2017-02-25 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/NAPO/ 272890 2017-03-14 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/ORELLANA/ 272889 2017-03-25 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 272888 2017-03-21 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272886 2017-05-18 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272885 2017-03-22 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232989 2016-03-16 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232988 2016-03-10 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 232986 2016-04-21 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232553 2016-05-22 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232542 2016-05-21 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 201207 2015-06-01 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200684 2015-05-08 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200683 2015-02-05 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 200682 2015-06-29 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200681 2015-05-14 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200680 2015-05-21 12gs	12	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 197496 2015-08-06 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 195876 2015-04-25 11gs	11	X	X	X	X	X							X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 194962 2015-06-06 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 194961 2015-02-18 13gs	13	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 194960 2015-06-05 12gs	12	X	X	X	X	X							X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9103/2022 2022-01-04 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/3916/2021 2021-12-22 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1062/2021 2021-12-29 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9112/2022 2022-01-14 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9092/2021 2021-12-31 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/819/2021 2021-12-20 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/AZUAY/4287/2021 2021-11-26 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9107/2022 2022-01-06 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9089/2021 2021-12-31 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1130/2022 2022-01-07 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/3922/2021 2021-12-26 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9064/2021 2021-12-15 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/827/2021 2021-12-31 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9077/2021 2021-12-27 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9126/2022 2022-01-26 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1064/2021 2021-12-30 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9078/2021 2021-12-27 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9082/2021 2021-12-28 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9083/2021 2021-12-28 HA 12gs	12	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X

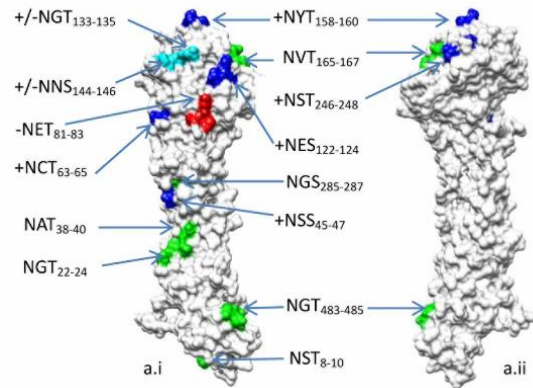
Fuente: Alfredo Bruno, 2022

En la tabla 3, ilustra los patrones de glicosilación en la región de la hemaglutinina del subtipo H3; en la primera columna detalla el nombre de las cepas o secuencias analizadas, en la segunda columna indica el número de sitios de glicosilación presentes en cada una de las muestras, de las columnas 3 a la 16, se detallan la ubicación de 14 sitios de glicosilación ubicados en los genes de la HA identificadas y reportados en los últimos 53 años, los cuales desempeñan un papel muy importante en la dinámica de evolución viral (Huang et al., 2017). La evolución de los genes de la HA y NA influyen en la transmisión del virus de la gripe, esto incluye la deriva antigénica y la acumulación de sitios de N- glicosilación. (Pentiah et al., 2014). La N-glicosilación de la HA actúa para enmascarar los epítopes antigénicos, limitar la unión a los anticuerpos del huésped y equilibrar las actividades de la HA. (Arinaminpathy & Grenfell, 2010)

Los sitios de N- glicosilación de la HA en las secuencias ecuatorianas durante los años 2021-2022 mostraron el mismo número de sitios con respecto a la última recomendación de la formulación de la vacuna de Influenza del hemisferio sur 2022-2023, realizada por la OMS, por lo que se puede evidenciar que no existen diferencia de mutaciones en estas posiciones de importancia para los sistemas de respuesta inmunológica.

Los sitios 8, 22, 38, 45, 63, 165, 246, 285, 483, fueron los más conservados entre las muestras analizadas en la región de la HA1 y se mantuvieron con un nivel de expresión estable durante el período de estudio; la posición 122 no se identificó en algunas secuencias del 2015 y 2016. Los sitios 126, 133, 144, 158 fueron los más variables debido probablemente a encontrarse en una zona con mayor presión inmunológica dentro de la hemaglutinina. (Arinaminpathy & Grenfell, 2010).

La ubicación 126, no se identificó en algunas secuencias del 2016 al 2019, pero si en otras secuencias de los mismos años, sin embargo, fue detectado en todas las secuencias del 2021 y 2022. La posición 133 se identificó durante el periodo 2015 al 2022, sin embargo, se presente de manera parcial en los años 2017, 2018 y 2019. La posición 144, se detectó en muy pocas muestras del año 2015, al igual que en las cepas de referencia vacunal recomendadas para el año 2015 y 2016, en secuencias ecuatorianas desde el año 2016 al 2022, esta mutación 144 no fue identificada, por lo que se considera que este cambio de glicosilación se extinguió debido al proceso de evolución viral. Finalmente, la ubicación 158 se ha identificado en los años 2016 al 2019, no obstante, en las secuencias de los años 2021 y 2022 no se observa en ninguna de las muestras de Ecuador y tampoco en la referencia vacunal del 2022-2023.

Figura 4. Mutaciones de las N-Glicosilación en la HA del subtipo A/H3N2

Fuente: Huang, Z.-Z., Yu, L., Huang, P., Liang, L.-J., & Guo, Q., 2017.

La glicosilación ligada a N, es una modificación postransduccional común de las glicoproteínas de los mamíferos, en la cual los oligosacáridos se unen mediante enlaces N-glucosídicos al residuo *Asn* del motivo de glicosilación. Las mutaciones de los 14 sitios de N-glicosilación en la HA analizados en la tabla 3, se ilustran en la presente figura en la disposición espacial en la proteína de la HA y acorde al número descrito en las columnas, dentro de los cuales, la mayoría de cambios, se encuentran dentro de la región HA1, debido a la alta presión inmunológica recibida. Además, el cambio 483-485 fue el único identificado en la región HA2, cuya expresión y composición se identificó de manera constante en todas las secuencias analizadas durante los años de estudio.

Según Huang et al., 2017, los sitios originales que aparecieron en 1968 hasta el año 2016 y aun se conservaron se encuentran de color verde, los sitios que dejaron de circular, se identifican con el color rojo. Las mutaciones antigénicas se basan en sustituciones de aminoácidos, donde el valor de la carga neta y el orden en los aminoácidos de cada epítipo son importantes, así como los aminoácidos cargados ubicados en el epítipo, deben corresponder eléctrica y espacialmente a los ubicados en la región determinante de la complementariedad del anticuerpo, algunas mutaciones que tengan carga similar pueden causar repulsión eléctrica de la unión del anticuerpo. La acumulación de mutaciones de epítipo antigénico podrían desencadenar en una epidemia, brote o afectar la efectividad de la vacuna aplicada, de igual manera las mutaciones de aminoácidos pueden influir en la patogenicidad viral hacia el huésped.

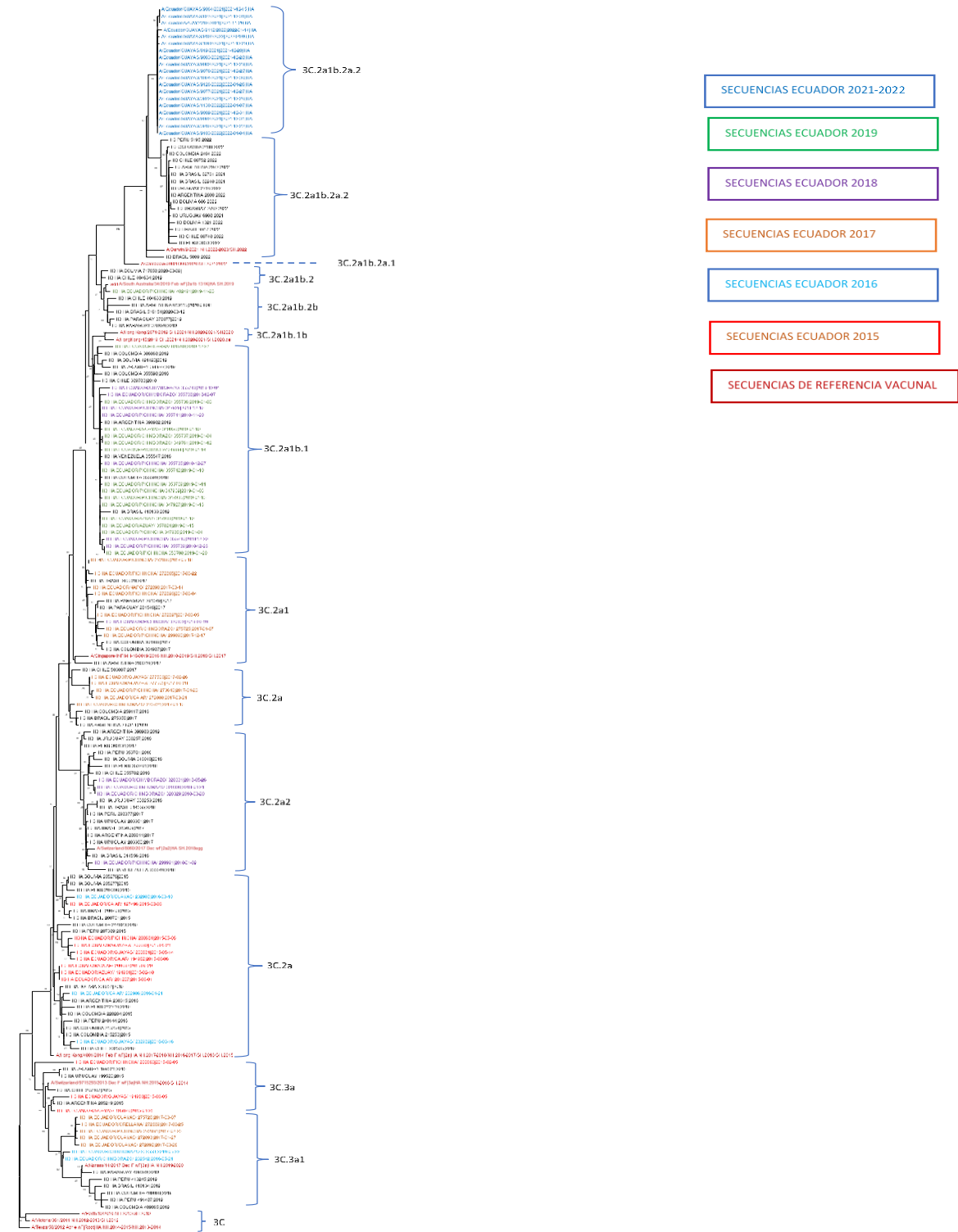
En la figura se puede observar que los sitios de N-glicosilación emergentes que se conservan hasta la fecha se etiquetaron en color azul y luego desaparecieron en color cian.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178231.g004>

4.3 Análisis filogenético de la región de la Hemaglutinina entre los virus de Influenza H3.

Las secuencias ecuatorianas del gen HA se compararon con secuencias de nucleótidos adicionales obtenidas a partir de GISAID (cita del artículo y/o sitio web). El análisis y alineación fue realizado mediante el software Bioedit, el árbol filogenético fue desarrollado con el uso del programa MEGA 11; en cuanto a la historia evolutiva se seleccionó el método de *Neighbor-Joining*

Figura 5. Análisis Filogenético región de la HA del subtipo A/H3N2



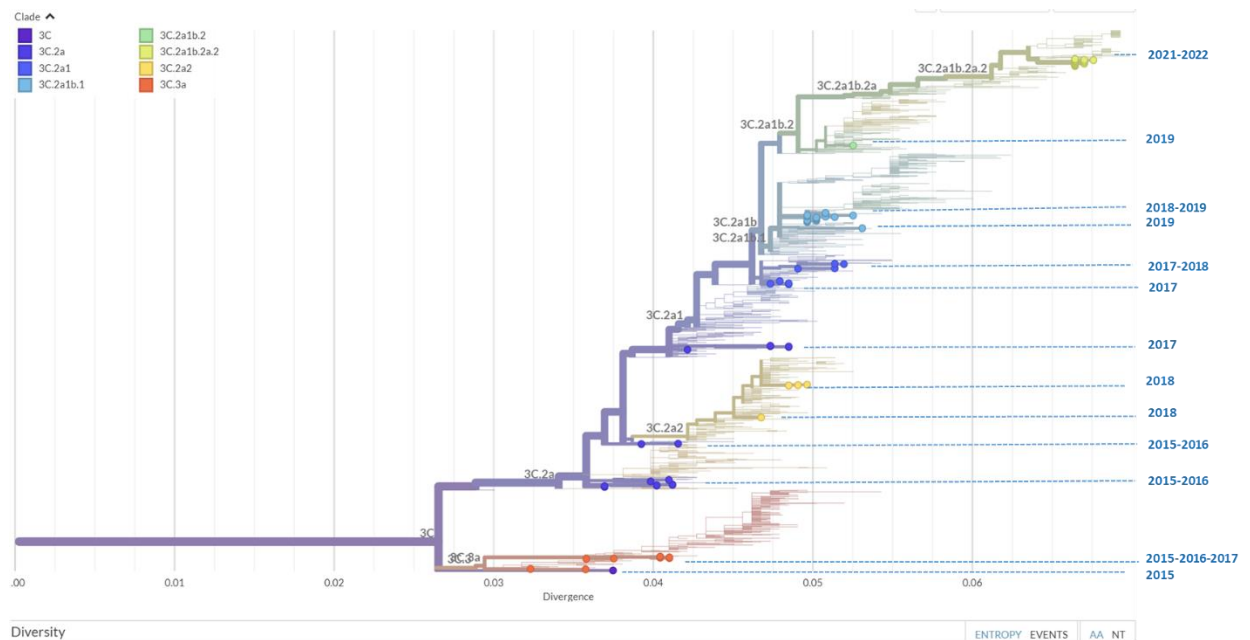
Fuente: Alfredo Bruno 2022

En el presente árbol filogenético, se puede apreciar la presencia de los clados y grupos genéticos conformados a partir de las secuencias analizadas, las muestras procedentes de Ecuador presentan un color para permitir una mejor visualización, teniendo de color celeste claro secuencias de los años 2021-2022; color verde en las secuencias de Ecuador del año 2019; color púrpura para secuencias del año 2018; color naranja para secuencias del año 2017; color turquesa para secuencias del año 2016; color rojo claro en secuencias del año 2015 y color rojo oscuro para las secuencias de referencia vacunal. El resto de secuencias utilizadas en el análisis del resto de países de Sudamérica se encuentran de color negro.

Entre las secuencias analizadas de Ecuador del 2015 y 2016, se identificó co-circulación de varios subclados en los grupos filogenéticos 3C, 3C.2a; 3C.3a y 3C.3, motivo por el cual, existieron varias secuencias que no se encontraban relacionadas filogenéticamente con las cepas recomendadas para la formulación de los años en mención. A partir del año 2017 se identifica el subclado 3C.2a1, adicional a los subclados 3C.2a; 3C.3a y 3C.3. Durante el año 2018 emerge el subclado 3C.2a1b.1, el cual predominó en el año 2019 y 3C.2a2.

Se puede apreciar claramente como la mayoría de secuencias de los años 2021 y 2022 de Ecuador se encuentran agrupadas en el subclado genético 3C.2a1b.2a.2 y cercanas genéticamente a secuencias pertenecientes a los países de la región sudamericana. Una secuencia del año 2022 del Perú se agrupó en el subclado 3C.2a1b.2a.1, también se identificó una secuencia de Brasil del año 2022 en el subclado 3C.2a1b.2.

En cuanto a las relaciones evolutivas de los taxones, utilizando el método *Neighbor Joining* mostrando el árbol óptimo, las longitudes de ramas se encuentran en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. Este análisis involucró a 177 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a+2^a+3^a+Sin codificación. Fueron eliminadas todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 1651 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron con el uso del programa MEGA 11. La fiabilidad de los árboles se estimó utilizando 1000 réplicas *bootstrap*. (Saitou N. and Nei M. 1987; Felsenstein J. 1985; Tamura K., Nei M., and Kumar S. 2004; Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021).

Figura 6. Evolución molecular del Virus de Influenza región H3-Ecuador 2015-2022.

Fuente: Alfredo Bruno 2022; Nextclade. <https://clades.nextstrain.org/tree, 2022>

La figura 5 ilustra los diferentes clados y subclados del subtipo H3 procedentes del Ecuador y se puede evidenciar la evolución a través del tiempo. Los clados y ramas del árbol se encuentran representados por colores, al final de cada nodo y hoja del árbol, se encuentran descrito mediante una línea de puntos el año en el cual fueron identificadas las secuencias genéticas con la finalidad de determinar el período de circulación por variantes genéticas. Se puede observar una gran variabilidad genética para el subtipo H3 entre las secuencias analizadas de Ecuador durante el periodo de estudio. En concordancia con las figuras y tablas presentados en la presente investigación, se identifican años que circularon subclados en diversos grupos genéticos, durante el año 2015 se agruparon secuencias en 4 ramas diferentes, el 2016 en 3 diversas ramas, el año 2017 de igual manera se obtuvieron secuencias procedentes de 3 ramas del árbol filogenético distintas, el 2018 en 4 ramas distintas, el 2019 también se identificó en 3 grupos diferentes, sin embargo durante los años 2021 y 2022, estas secuencias fueron agrupadas en una sola rama del árbol filogenético, lo que evidencia una menor evolución del virus en los últimos 2 años debido probablemente a la introducción del virus pandémico del SARS CoV-2 en la población mundial, así como las medidas de prevención, cuarentena aislamiento y limitaciones de movilidad que se implementaron en casi todos los países de nivel global.

Tabla 4. Análisis comparativo de aminoácidos entre secuencias de Ecuador 2022 con respecto a A/Darwin/9/2021 NH.2022-2023/SH.2022

A/Darwin/9/2021	HA - H3 Ecuador 2022
HA1:L3I	HA1:L3I
HA1:Q33R	HA1:Q33R
HA1:S45N	HA1:S45N
HA1:T48I	HA1:T48I
HA1:G50E	HA1:G50E
HA1:E62G	HA1:D53N (D69N)
HA1:K83E	HA1:E62G
HA1:K92R	HA1:K83E
HA1:Y94N	HA1:K92R
HA1:N121K	HA1:Y94N
HA1:D122N	HA1:N121K
HA1:T131K	HA1:D122N
HA1:S138A	HA1:T131K
HA1:K140I	HA1:S138A
HA1:R142G	HA1:K140I
HA1:N144S	HA1:R142G
HA1:N145S	HA1:N144S
HA1:H156S	HA1:N145S
HA1:K158N	HA1:H156S
HA1:F159N	HA1:K158N
HA1:K160I	HA1:F159N
HA1:L164Q	HA1:K160I
HA1:N171K	HA1:L164Q
HA1:K173Q	HA1:N171K
HA1:V186N	HA1:K173Q
HA1:N189K	HA1:V186D (N202D)
HA1:D190N	HA1:N189K
HA1:F193S	HA1:D190N
HA1:Y195F	HA1:F193S
HA1:A198S	HA1:Y195F
HA1:T212A	HA1:A198S
HA1:N225G	HA1:T212A
HA1:N278K	HA1:N225D (G241D)
HA1:N312S	HA1:N278K
HA2:I32R	HA1:N312S
HA2:N46D	HA2:I32R
HA2:I77V	HA2:N46D
HA2:R121K	HA2:G50R (G395R)
HA2:G155E	HA2:I77V
HA2:D160N	HA2:I108V (I453V)
HA2:I193M	HA2:R121K
HA2:V200I	HA2:G155E
	HA2:D160N
	HA2:K179N (K524N)
	HA2:I193M
	HA2:V200I
	HA1:V4A
	HA2:Q27H

MUTACIONES IDENTIFICADAS EN SECUENCIAS DE ECUADOR NO IDENTIFICADAS EN LA RECOMENDACIONAL VACUNAL 2022-2023

MUTACIONES IDENTIFICADAS EN LA RECOMENDACIONAL VACUNAL 2022-2023 Y NO PRESENTES EN LAS SECUENCIAS DE ECUADOR 2022

Fuente: Alfredo Bruno, 2022

En la tabla número 4, se ilustra un análisis comparativo de cambios de aminoácidos identificados entre la recomendación de la OMS en la formulación vacunal de H3N2 para el 2022 y 2023 (A/Darwin/9/2021), mediante el uso de la herramienta *Nextclade*, se identificó las mutaciones de aminoácidos entre las secuencias ecuatorianas del año 2022. En la primera columna se puede observar los cambios de aminoácidos presentes en la cepa vacunal, los cuales, se encuentran resaltados de color naranja y en la segunda columna se detalla los cambios de aminoácidos con respecto a A/Darwin/9/2021, los cuales se encuentran resaltados de verde. El resto de cambios de aminoácidos que no presentan coloración son comunes entre la recomendación de la vacuna y las secuencias ecuatorianas de la región de la hemaglutinina del subtipo H3 analizadas en Ecuador. De las 42 mutaciones identificadas en A/Darwin/9/2021, 40 se encuentran presentes en las secuencias de Ecuador lo que evidencia la similitud genética con la formulación recomendada para el hemisferio norte y sur 2022-2023. Adicionalmente, se identificaron 4 mutaciones en la región HA1 y 4 mutaciones en la región HA2 de las secuencias ecuatorianas del año 2022: HA1:D53N; HA1:V186D; HA1:N225D; HA2:G50R; HA2:I108V; HA2:K179N; HA1:V4A; HA2:Q27HA

La mutación D53N ha sido relacionada a efectos sobre la interface de oligomerización viral, sitios de reconocimiento del anticuerpo y la unión al ligando (Boonnak et al., 2021). Por su parte, el cambio V186D, sido asociada en virus H5 como un mutante de escape parcial y mejora la unión al SA-2,6 Gal, el cual es la especificidad del receptor humano (Chen et al., 2009). Se ha reportado que esta posición de cambio se encuentra asociada a cambios con la deriva antigénica/mutante de escape, virulencia y cambio de especificidad del huésped.

La mutación N225D, se ha descrito que altera la especificidad del receptor de la célula huésped desde el alfa-2,6 humano para incluir también el ácido siálico alfa-2,3 de tipo aviar, que es más común en las células humanas ciliadas del tracto respiratorio inferior (Liu et al. 2010). Aunque esta mutación se ha encontrado en mayores proporciones en los casos graves, es importante considerar que esta mutación también puede producirse como adaptación a los procesos de cultivo en huevos embrionados o cultivo celular, sin embargo, es de relevancia si se encuentra en la muestra original como aconteció en la secuencia analizada en el presente trabajo, adicionalmente se encuentra asociada a cambios en la interface de oligomerización viral, afectación en los sitios de reconocimiento de anticuerpos.

Acorde a lo descrito en la plataforma [epiflu.org](https://platform.epiflu.org/) disponible en <https://platform.epiflu.org/>.2022, los cambios HA2:G50R, HA2:I108V; HA2:K179N; HA1:V4A; HA2:Q27H, se han observado en

las estructuras resueltas de las proteínas de cepas relacionadas, con variaciones en los sitios de reconocimiento de anticuerpos, en la interfaz de oligomerización viral, unión de proteínas al huésped y en la unión de pequeños ligandos.

4.4 Conclusiones

En Ecuador puede observar una alta diversidad genética; representado por los clados y subclados: 3C; 3C.2a; 3C.3a; 3C.2a1; 3C.2a1b.1; 3C.2a2; 3C.2a1b.2. En el año 2015 co-circularon los linajes 3C.2a; 3C.3a y 3C.3; los 3C.2a, que se encuentran relacionados con la cepa utilizada para el año siguiente del hemisferio norte y sur de los años 2016 al 2018 y solo las secuencias agrupadas en los linajes 3C.3a coincidieron con la recomendación del hemisferio sur 2015 y hemisferio norte 2015-2016, por lo que podríamos inferir que los clados/subclados se encontraban circulando en el Ecuador previo a la formulación recomendada.

En el año 2016 se identificaron la co-circulación de los subclados 3C.2a; 3C.3a, los mismos que se encuentran relacionadas con las formulaciones de la vacuna para el año 2016. Muestras del año 2017 se detectaron los subclados 3C.2a; 3C.3a, 3C.2a1. Existen 2 grupos filogenéticos principales uno de los cuales, se agrupa con A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (NH-2018-2019; SH-2018 del subclado 3C.2a1), sin embargo, existe el otro grupo genético relacionado con el subclado 3C.2a. Las muestras del año 2018 se encuentran relacionadas filogenéticamente con los subclados 3C.2a1; 3C.2a1b.1; 3C.2a2. Se identificaron secuencias genéticas que se agruparon con distintas recomendaciones vacunales de años posteriores, entre ellas: A/HongKong/45/2019 (NH-2020-2021) y A/Hong_Kong/2671/2019 (SH-2021), por lo que se puede concluir que durante al año 2018, se adelantó la circulación del virus a la recomendación vacunal. Existe otro grupo filogenético del año que se relacionó con la formulación del hemisferio sur para el año 2018.

Durante al año 2019 se identificó un predominio de 3C.2a1b.1 y una secuencia agrupada dentro del subclado 3C.2a1b.2, sin embargo, las cepas recomendadas se encuentran dentro de los grupos 3C.3a1 para el hemisferio norte y 3C.2a1b.2 para el hemisferio sur. No se identificó ninguna secuencia del subtipo H3 durante el año 2020. Es importante destacar que desde el año 2021, durante el presente estudio se identificó exclusivamente el subclado 3C.2a1b.2 hasta la actualidad, los cuales se encuentran relacionados filogenéticamente con la recomendación de la vacuna, esta poca divergencia del virus podría deberse a la presencia de la pandemia del COVID-19 y las medidas de contención aplicadas a nivel mundial, las cuales

afectaron la propagación de los virus respiratorios y por ende a las dinámicas de evolución viral.

Los cambios de aminoácidos en la región de la hemaglutinina del subtipo H3, tienen un rol muy importante en la evolución viral, lo cual puede causar un gran impacto en salud pública y en sus principales estrategias de prevención y control como es la vacunación. Es necesario describir la variabilidad de las posiciones de los cambios de N-glicosilación para comprender los mecanismos de evolución, la patogénesis de la enfermedad y los mecanismos de respuesta del virus frente a las vacunas. En este trabajo se identificaron los sitios de glicosilación con sustituciones entre los residuos de aminoácidos de manera convergentes entre la recomendación de la vacuna del hemisferio norte 2022 – 2023, hemisferio sur 2022 y las secuencias ecuatorianas del 2019 hasta el 2022. Esto evidencia la similitud de los subclados circulantes en Ecuador con respecto a la recomendación vacunal de la OMS. Sin embargo, se identificaron mutaciones adicionales en las secuencias ecuatorianas que no estuvieron presentes en la cepa vacunal.

La mayor cantidad de mutaciones fueron identificadas en los residuos de aminoácidos en la región de unión al receptor de HA1, que es donde se identificaron la mayor cantidad de cambios de nucleótidos, estas mutaciones pueden alterar la preferencia de unión de influenza por ende, es necesario fortalecer la vigilancia genómica de virus respiratorios de manera sistemática y rutinaria, que permita generar una mejor comprensión referente a la evolución y variación genética del virus, como un requisito previo para mejorar la estrategia de prevención control y respuesta a la influenza mediante la vacunación y otras medidas de prevención en salud pública para disminuir el impacto y la propagación del virus en la población así como posibles reordenamiento genético que pueda dar origen a un nuevo tipo o subtipo del virus con potencial epidémico - pandémico.

5. BIBLIOGRAFIA:

Iuliano, A. D., Roguski, K. M., Chang, H. H., Muscatello, D. J., Palekar, R., Tempia, S., Cohen, C., Gran, J. M., Schanzer, D., Cowling, B. J., Wu, P., Kyncl, J., Ang, L. W., Park, M., Redlberger-Fritz, M., Yu, H., Espenhain, L., Krishnan, A., Emukule, G., Mustaqim, D. (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*, 391(10127). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2).

Kang, M., Zanin, M., & Wong, S.-S. (2022). Subtype H3N2 Influenza A Viruses: An Unmet Challenge in the Western Pacific. *Vaccines*, 10(1), 112. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010112>

Jester, B. J., Uyeki, T. M., & Jernigan, D. B. (2020). Fifty Years of Influenza A(H3N2) Following the Pandemic of 1968. *American Journal of Public Health*, 110(5), 669–676. <https://doi.org/10.2105/ajph.2019.305557>

Ferguson, N.M., Galvani, A.P., Bush, R.M., 2003. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422:428-433. doi: 10.1038/nature01509.

WHO. Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. (n.d.). Retrieved April 5, 2022, from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440>

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>

Trovão, N. S., Khan, S. M., Lemey, P., Nelson, M. I., & Cherry, J. L. (2022). Evolution of influenza A virus hemagglutinin H1 and H3 across host species. <https://doi.org/10.1101/2022.04.20.488870>

Caini, S., Andrade, W., Badur, S., Balmaseda, A., Barakat, A., Bella, A., Bimohuen, A., Brammer, L., Bresee, J., Bruno, A., Castillo, L., Ciblak, M. A., Clara, A. W., Cohen, C., Cutter, J., Daouda, C., de Lozano, C., de Mora, D., Dorji, K., Pechirra, P. (2016). Temporal patterns of influenza A and B in tropical and temperate countries: what are the lessons for influenza vaccination? *PLoS ONE*, 11(3). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152310>

Caini, S., de Mora, D., Olmedo, M., Portugal, D., Becerra, M. A., Mejía, M., Pacurucu, M. C., Ojeda, J., Bonaccorsi, G., Lorini, C., Paget, J., & Bruno, A. (2018). The epidemiology and severity of respiratory viral infections in a tropical country: Ecuador, 2009–2016. *Journal of Infection and Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.12.003>

Durand, L. O., Cheng, P. Y., Palekar, R., Clara, W., Jara, J., Cerpa, M., el Omeiri, N., Roperó-Alvarez, A. M., Ramírez, J. B., Araya, J. L., Acosta, B., Bruno, A., Calderon de Lozano, C., Castillo Signor, L. del C., Matute, M. L., Jackson-Betty, S., Mung, K. S., Diaz-Quiñonez, J. A., Lopez-Martinez, I., ... Azziz-Baumgartner, E. (2016). Timing of influenza epidemics and vaccines in the American tropics, 2002-2008, 2011-2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 10(3), 170-175. <https://doi.org/10.1111/irv.12371>.

Castaneda, Martinez, Lopez. Major pandemics and their challenges. Dilemas contemp. educ. política valores vol.8 no.3 Toluca de Lerdo may./ago. 2021. Epub 11-Jun-2021.
<https://doi.org/10.46377/dilemas.v8i3.2671>.

Uyeki, T. M., Hui, D. S., Zambon, M., Wentworth, D. E., & Monto, A. S. (2022). Influenza. The Lancet, 400(10353), 693–706. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5)

WHO. Flunet summary. Periodo del 30 mayo al 12 de junio. Disponible en: <https://www.who.int/tools/flunet/flunet-summary>. Fecha de captura 7 de julio 2022.

CDC. Actualización de la reunión sobre la gripe del ACIP. Disponible en <https://www.cdc.gov/flu/spotlights/2021-2022/specific-vaccines-seniors.htm>. Fecha de captura 7 de julio 2022.

Organización Mundial de la Salud. Composición recomendada de las vacunas contra el virus de la influenza para usar en la temporada de influenza del hemisferio norte 2013-2014. Disponible http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/ (Consultado el 24 de noviembre de 2014).

Mello WA , Paiva TM , Ishida MA et al . El dilema de las recomendaciones de vacunas contra la influenza cuando se aplican a los trópicos: el caso brasileño examinado en escenarios alternativos. PLoS UNO 2009 ; 4 : e5095.

Bloom-Feshbach, K., Alonso, W. J., Charu, V., Tamerius, J., Simonsen, L., Miller, M. A., & Cile Viboud, C. (n.d.). 2003. Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054445>.

Viboud, C., Alonso, W. J., & Simonsen, L. (2006). Influenza in tropical regions. In PLoS Medicine (Vol. 3, Issue 4, pp.468-471). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030089>

Leite, J. A., Resende, P., Araya, J. L., Barrera, G. B., Baumeister, E., Caicedo, A. B., Coppola, L., de Mello, W. A., de Mora, D., dos Santos, M. C., Fasce, R., Fernández, J., Goñi, N., Martínez, I. L., Mayhwa, J. O., Motta, F., Nuñez, M. C. H., Ojeda, J., Ortega, M. J., Palekar, R. (2020). Genetic evolution of influenza viruses among selected countries in Latin America, 2017–2018. PLOS ONE, 15(3), e0227962. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227962>

De Mora, D., Olmedo, M., Paez, M., Garcés, J., González, M., Logroño, D., Bruno, A. (2022). Primer Plan operativo para la vigilancia genómica sistemática y rutinaria nacional del SARS-COV-2 en Ecuador. INSPIPILIP Revista Ecuatoriana De Ciencia, Tecnología E Innovación En Salud Pública, 5(3), 1–5. <https://doi.org/10.31790/inspilip.v5i3.232>

Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Nextclade. (2022). Nextclade. Nextstrain.org; Nextclade. <https://clades.nextstrain.org/>

Zheng, Z., Paul, S., Mo, X., Yuan, Y.-R., & Tan, Y.-J. (2018). The Vestigial Esterase Domain of Haemagglutinin of H5N1 Avian Influenza A Virus: Antigenicity and Contribution to Viral Pathogenesis. Vaccines, 6(3), 53. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030053>

Huang, Z.-Z., Yu, L., Huang, P., Liang, L.-J., & Guo, Q. (2017). Charged amino acid variability related to N-glyco -sylation and epitopes in A/H3N2 influenza: Hem -agglutinin and neuraminidase. PLOS ONE, 12(7), e0178231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178231>

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.

Pentiah, K., Lees, W. D., Moss, D. S., & Shepherd, A. J. (2014). N-Linked glycans on influenza A H3N2 hemagglutinin constrain binding of host antibodies, but shielding is limited. Glycobiology, 25(1), 124–132. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu097>

Arinaminpathy, N., & Grenfell, B. (2010). Dynamics of Glycoprotein Charge in the Evolutionary History of Human Influenza. PLoS ONE, 5(12), e15674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015674>

Boonnak, K., Mansanguan, C., Schuerch, D., Boonyuen, U., Lerdsamran, H., Jiamsomboon, K., Sae Wang, F., Huntrup, A., Prasertsopon, J., Kosoltanapiwat, N., & Puthavathana, P. (2021). Molecular Characterization of Seasonal Influenza A and B from Hospitalized Patients in Thailand in 2018–2019. Viruses, 13(6), 977. <https://doi.org/10.3390/v13060977>

Chen, Y., Qin, K., Wu, W. L., Li, G., Zhang, J., Du, H., Ng, M. H., Shih, J. W.-K., Peiris, J. S. M., Guan, Y., Chen, H., & Xia, N. (2009). Broad Cross-Protection against H5N1 Avian Influenza Virus Infection by Means of Monoclonal Antibodies that Map to Conserved Viral Epitopes. Journal of Infectious Diseases, 199(1), 49–58. <https://doi.org/10.1086/594374>

Liu, Y., Childs, R. A., Matrosovich, T., Wharton, S., Palma, A. S., Chai, W., Daniels, R., Gregory, V., Uhlenendorff, J., Kiso, M., Klenk, H.-D., Hay, A., Feizi, T., & Matrosovich, M. (2010). Altered Receptor Specificity and Cell Tropism of D222G Hemagglutinin Mutants Isolated from Fatal Cases of Pandemic A(H1N1) 2009 Influenza Virus. Journal of Virology, 84(22), 12069–12074. <https://doi.org/10.1128/jvi.01639-10>

GISAIID. Epiflu.org. <https://platform.epiflu.org>. (2022).

6. ANEXOS:

Anexo 1. Diferencia de aminoácidos entre las cepas vacunales y los clados de la región de la Hemaglutinina Ecuador

Isolate	#	Positions Different
A/Darwin/9/2021 NH.2022-2023/SH.2022		
A/Cambodia/e0826360/2020 NH.2021-2022	9	156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 198, 225
A/Hong Kong/2671/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH2020	17	83, 94, 128, 131, 135, 137, 138, 156, 159, 164, 186, 190, 195, 219, 225, 522, 529
A/Kansas/14/2017 Dec F wF 3a HA NH.2019-2020	25	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 225, 326, 406, 478, 484, 522, 529
vidrl A/South Australia/34/2019 Feb wF 2a1b 131K HA SH.2019	14	83, 94, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 347, 522
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 NH.2018-2019/SH.2018/SH.2017	18	62, 83, 92, 94, 131, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 194, 195, 311, 479, 522, 529
A/Switzerland/8060/2017 Dec wF 2a2 HA SH.2018egg	23	62, 83, 92, 94, 96, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529
A/Hong Kong/4801/2014 Feb F wF 2a HA NH.2017-2018/NH.2016-2017/SH.2016/SH.2015	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
A/Switzerland/9715293/2013 Dec F wF 3a HA NH.2015-2016/SH.2014	26	3, 62, 83, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 326, 406, 484, 489, 522, 529
A/Texas/50/2012 Apr e wF Root HA NH.2014-2015/NH.2013-2014	28	3, 62, 83, 92, 94, 121, 128, 131, 142, 144, 145, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 198, 219, 225, 406, 484, 489, 522, 529
A/HongKong/45/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH.2020.cell	18	83, 94, 128, 131, 135, 137, 138, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 195, 225, 312, 522, 529
A/Perth/10/2010_NH.2013/SH.2010	36	3, 33, 45, 48, 53, 62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 144, 145, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 198, 219, 223, 225, 230, 278, 280, 312, 406, 484, 489, 522, 529
A/Victoria/361/2011_NH.2012-2013/SH.2012	27	3, 33, 62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 144, 145, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 278, 406, 484,

		489, 522, 529
H3 HA ECUADOR/IBARRA/ 628769 2019-12-27	19	31, 83, 94, 128, 131, 135, 140, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 505, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 402491 2019-11-23	14	83, 94, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 219, 225, 347, 522
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 357824 2019-01-15	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355743 2018-12-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355742 2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355741 2018-11-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355740 2018-12-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355739 2018-12-26	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355738 2018-12-07	17	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 223, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355737 2019-01-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355736 2019-01-03	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355735 2018-12-27	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 353709 2019-01-11	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 353708 2019-01-20	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 349956 2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 349898 2019-01-14	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 349761 2019-01-12	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529

H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347939 2019-01-03	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 347936 2019-01-04	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347935 2019-01-13	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 347933 2019-01-10	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347929 2018-12-16	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347927 2019-01-16	16	83, 94, 128, 131, 135, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 320332 2018-03-16	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320331 2018-05-26	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320330 2018-04-21	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320329 2018-03-20	24	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 212, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529, 530
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299991 2018-01-09	22	62, 83, 92, 94, 121, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 261, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299890 2017-12-17	21	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 158, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 408, 516, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/_277506 2017- 02-26	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 277505 2017-03-28	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 275726 2017-03-07	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 242, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275725 2017-04-07	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529

H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275724 2017-04-13	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 259, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 273640 2017-04-23	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 323, 509, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272897 2017-03-05	18	58, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272896 2017-03-04	17	53, 62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272893 2017-01-27	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 312, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272892 2017-03-28	27	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 261, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272891 2017-02-25	26	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/NAPO/ 272890 2017-03-14	16	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/ORELLANA/ 272889 2017-03-25	26	5, 53, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 219, 225, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 272888 2017-03-21	20	62, 83, 92, 94, 121, 131, 156, 159, 160, 164, 169, 186, 190, 193, 195, 198, 225, 311, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272886 2017-05-18	16	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272885 2017-03-22	17	62, 83, 94, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 186, 190, 193, 195, 225, 329, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232989 2016-03-16	26	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 169, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 261, 276, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232988 2016-03-10	23	62, 83, 92, 94, 121, 124, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 232986 2016-04-21	23	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232553 2016-05-22	24	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 225, 326, 406, 484, 522, 529

H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232542 2016-05-21	24	62, 83, 91, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 195, 225, 326, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 201207 2015-06-01	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200684 2015-05-08	23	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200683 2015-02-05	31	3, 5, 62, 83, 92, 94, 112, 121, 122, 128, 131, 144, 156, 157, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 347, 406, 484, 489, 522, 529, 531, 534
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 200682 2015-06-29	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200681 2015-05-14	24	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200680 2015-05-21	26	62, 83, 92, 94, 121, 124, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 462, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 197496 2015-08-06	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 195876 2015-04-25	27	3, 62, 83, 92, 94, 121, 124, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 326, 347, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 194962 2015-06-06	24	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 197, 225, 311, 406, 484, 522, 529, 532
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 194961 2015-02-18	22	62, 83, 92, 94, 121, 131, 142, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 311, 406, 484, 522, 529
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 194960 2015-06-05	26	3, 62, 83, 92, 94, 121, 128, 131, 138, 144, 156, 159, 160, 164, 171, 186, 190, 193, 195, 225, 300, 326, 406, 484, 522, 529
A/Ecuador/GUAYAS/9103/2022 2022-01-04 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/3916/2021 2021-12-22 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/1062/2021 2021-12-29 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9112/2022 2022	6	53, 186, 225, 356, 437, 508

-01-14 HA		
A/Ecuador/GUAYAS/9092/2021 2021-12-31 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/819/2021 2021-12-20 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/AZUAY/4287/2021 2021-11-26 HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9107/2022 2022-01-06 HA	6	53, 186, 225, 379, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9089/2021 2021-12-31 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/1130/2022 2022-01-07 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/3922/2021 2021-12-26 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9064/2021 2021-12-15 HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/827/2021 2021-12-31 HA	6	53, 186, 225, 278, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9077/2021 2021-12-27 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9126/2022 2022-01-26 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/1064/2021 2021-12-30 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9078/2021 2021-12-27 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9082/2021 2021-12-28 HA	5	53, 186, 225, 437, 508
A/Ecuador/GUAYAS/9083/2021 2021-12-28 HA	5	53, 186, 225, 437, 508

Anexo 2. Diferencia entre sitios de glicosilación de cepas vacunales y clados región HA Ecuador

Strain	#	8	22	38	45	63	122	126	133	144	158	165	246	285	483
A/DARWIN/9/2021 NH.2022-2023/SH.2022_12GS	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/CAMBODIA/E0826360/2020 NH.2021-2022_12GS	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/HONG KONG/2671/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH2020_10GS	10	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X
A/KANSAS/14/2017 DEC F WF 3A HA NH.2019-2020_11GS	11	X	X	X	X	X	X		X			X	X	X	X
VIDRL A/SOUTH AUSTRALIA/34/2019 FEB WF 2A1B 131K HA SH.2019_13GS	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
A/SINGAPORE/INFIMH-16-0019/2016 NH.2018-2019/SH.2018/SH.2017_12GS	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/SWITZERLAND/8060/2017 DEC WF 2A2 HA SH.2018EGG_13GS	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
A/HONG KONG/4801/2014 FEB F WF 2A HA NH.2017-2018/NH.2016-2017/SH.2016/SH.2015_13GS	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
A/SWITZERLAND/9715293/2013 DEC F WF 3A HA NH.2015-2016/SH.2014_12GS	12	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
A/TEXAS/50/2012 APR E WF ROOT HA NH.2014-2015/NH.2013-2014_12GS	12	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
A/HONGKONG/45/2019 SH.2021/NH.2020-2021/SH.2020.CELL_11GS	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
A/PERTH/10/2010_NH.2013/SH.2010_12GS	12	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X
A/VICTORIA/361/2011_NH.2012-2013/SH.2012_13GS	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/IBARRA/ 628769 2019-12-27_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 402491 2019-11-23_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 357824 2019-01-15_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X

H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355743 2018-12-04_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355742 2019-01-10_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355741 2018-11-20_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355740 2018-12-20_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355739 2018-12-26_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355738 2018-12-07_10gs	10	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355737 2019-01-04_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 355736 2019-01-03_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 355735 2018-12-27_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 353709 2019-01-11_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 353708 2019-01-20_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 349956 2019-01-10_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 349898 2019-01-14_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 349761 2019-01-12_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347939 2019-01-03_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA 347936 2019-01-04_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347935 2019-01-13_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 347933 2019-01-10_11gs	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/	11	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X

347929 2018-12-16_11gs															
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 347927 2019-01-16_11gs	11	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 320332 2018-03-16_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320331 2018-05-26_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320330 2018-04-21_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 320329 2018-03-20_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299991 2018-01-09_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 299890 2017-12-17_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/_277506 2017- 02-26_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 277505 2017- 03-28_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 275726 2017- 03-07_11gs	11	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275725 2017-04-07_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 275724 2017-04-13_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 273640 2017-04-23_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272897 2017-03-05_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272896 2017-03-04_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272893 2017- 01-27_11gs	11	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 272892 2017- 03-28_11gs	11	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272891 2017-02-25_11gs	11	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X

H3 HA ECUADOR/NAPO/ 272890 2017-03-14_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/ORELLANA/ 272889 2017-03-25_11gs	11	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 272888 2017-03-21_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272886 2017-05-18_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 272885 2017-03-22_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232989 2016-03-16_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 232988 2016-03-10_11gs	11	X	X	X	X	X		X	X				X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 232986 2016-04-21_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232553 2016-05-22_11gs	11	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CHIMBORAZO/ 232542 2016-05-21_11gs	11	X	X	X	X	X	X		X				X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 201207 2015-06-01_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200684 2015-05-08_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/PICHINCHA/ 200683 2015-02-05_11gs	11	X	X	X	X	X			X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 200682 2015-06-29_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200681 2015-05-14_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 200680 2015-05-21_12gs	12	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 197496 2015-08-06_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 195876 2015-04-25_11gs	11	X	X	X	X	X			X	X			X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/CAÑAR/ 194962 2015-	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X

06-06_13gs															
H3 HA ECUADOR/AZUAY/ 194961 2015-02-18_13gs	13	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
H3 HA ECUADOR/GUAYAS/ 194960 2015-06-05_12gs	12	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9103/2022 2022-01-04 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/3916/2021 2021-12-22 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1062/2021 2021-12-29 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9112/2022 2022-01-14 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9092/2021 2021-12-31 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/819/2021 2021-12-20 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/AZUAY/4287/2021 2021-11-26 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9107/2022 2022-01-06 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9089/2021 2021-12-31 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1130/2022 2022-01-07 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/3922/2021 2021-12-26 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9064/2021 2021-12-15 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/827/2021 2021-12-31 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9077/2021 2021-12-27 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9126/2022 2022-01-26 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/1064/2021 2021-12-30 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X

A/Ecuador/GUAYAS/9078/2021 2021-12-27 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9082/2021 2021-12-28 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
A/Ecuador/GUAYAS/9083/2021 2021-12-28 HA_12gs	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X

Anexo 3. Script para realizar gráfico Muller Plot en R

```
library(MullerPlot)
```

```
ATRIBUTO = read.csv(file.choose())
```

```
ATRIBUTO =  
read.csv('C:/Users/alfre/OneDrive/Escritorio/TS/PUCE/FINAL/ATRIBUTOSS.csv', sep = ',')
```

```
POBLACION = read.csv(file.choose())
```

```
POBLACION =  
read.csv('C:/Users/alfre/OneDrive/Escritorio/TS/PUCE/FINAL/population.datalist.csv', sep = ',')
```

```
summary(ATRIBUTO)
```

```
summary(POBLACION)
```

```
data("ATRIBUTO")
```

```
data(ATRIBUTO)
```

```
ATRIBUTO
```

```
POBLACION
```

```
layout(matrix(c(1,2), nrow = 1), widths = c(0.8, 0.2))
```

```
par(mar=c(3, 3, 1, 0))
```

```
m.plot <- Muller.plot(attributes = ATRIBUTO, population.data = POBLACION,  
                      data.method = "list", time.interval.method = "linear", mgp=c(2,0.5,0))
```

```
plot(0,0,axes = F)
```

```
par(mar=c(0, 0, 0, 0))
```

```
legend("right", legend = m.plot$name,col = as.character(m.plot$color),pch = 19)
```