

Jordi Reina

# Los linajes Victoria y Yamagata de los virus gripales B, desconocidos y poco valorados

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Facultad de Medicina (UIB). Palma de Mallorca.

**Article history**

Received: 16 November 2021; Accepted: 23 December 2021; Published: 18 February 2022

**RESUMEN**

El virus gripal B pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y al género *Influenzavirus B*. Presenta un genoma de tipo ARN negativo formado por unos 14.648 nucleótidos divididos en ocho segmentos distintos que codifican unas 11 proteínas. Antes de 1980 todos los virus de la gripe B pertenecían a un único linaje genético; pero en este año emergieron dos linajes antigénica y genéticamente distintos que se denominaron B/Victoria/2/1987 y B/Yamagata/16/1988. Se han podido demostrar procesos de intercambio genético intralíneas y entre líneas; de ellos los más frecuentes son aquellos en los que el linaje Victoria adquiere genes del linaje Yamagata. Se ha propuesto que las diferencias en las dinámicas evolutivas de los dos linajes se deban a las diferentes preferencias de unión de la hemaglutinina gripal al receptor celular. El linaje Victoria ha mostrado capacidad para unirse a los receptores celulares con restos de ácido siálico en las posiciones  $\alpha$ -2,3 y  $\alpha$ -2,6; mientras que el linaje Yamagata lo hace exclusivamente en las posiciones humanas  $\alpha$ -2,6 del tracto respiratorio. La escasa circulación en los últimos meses podría haber contribuido a la eliminación ("extinción") temporal del linaje Yamagata. Desde 2017 la casi totalidad de las cepas de este linaje pertenecen al clado 3A, cuando con anterioridad se detectaban clados múltiples circulando. Aunque este clado 3A es diverso a nivel genético y ha adquirido mutaciones sustitutivas en el gen de la hemaglutinina, éstas no han determinado cambios antigénicos significativos que hayan obligado a sustituir su componente antigénico (B/Pukhet/3073/2013) en la vacuna gripal desde 2015.

**Palabras clave:** Gripe B; Linaje Victoria, Linaje Yamagata; Evolución genética

**The Victoria and Yamagata Lineages of Influenza B Viruses, unknown and undervalued****ABSTRACT**

The influenza virus B belongs to the family *Orthomyxoviridae* and to the genus *Influenzavirus B*. It has a negative RNA-type genome made up of about 14,648 nucleotides divided into eight different segments that encode about 11 proteins. Before 1980 all influenza B viruses belonged to a single genetic lineage; but in this year two antigenically and genetically distinct lineages emerged which were named B/Victoria/2/1987 and B/Yamagata/16/1988. Intralinear and interlinear genetic exchange processes have been demonstrated; The most frequent of them are those in which the Victoria lineage acquires genes from the Yamagata lineage. It has been proposed that the differences in the evolutionary dynamics of the two lineages are due to the different binding preferences of influenza hemagglutinin to the cellular receptor. The Victoria lineage has shown the ability to bind to cell receptors with sialic acid residues at the  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6 positions; whereas the Yamagata lineage does so exclusively in the human  $\alpha$ -2,6 positions of the respiratory tract. Low circulation in recent months may have contributed to the temporary elimination ("extinction") of the Yamagata lineage. Since 2017, almost all of the strains of this lineage belong to clade 3A, when previously multiple circulating clades were detected. Although this clade 3A is diverse at the genetic level and has acquired surrogate mutations in the hemagglutinin gene, these have not determined significant antigenic changes that have made it necessary to replace its antigenic component (B/Pukhet/3073/2013) in the influenza vaccine since 2015.

**Keywords:** Influenza B; Victoria Lineage, Yamagata Lineage; Genetic evolution

Correspondencia:

Jordi Reina

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Facultad de Medicina (UIB). Carretera Valldemossa 79, 07120 Palma de Mallorca.  
E-mail: jorge.reina@ssib.es

## INTRODUCCIÓN

En 1940 se produjo un brote de una enfermedad respiratoria aguda en la población infantil que clínicamente era semejante a la gripe. De estos pacientes se consiguió aislar un virus nuevo que era serológicamente distinto del ya conocido virus gripal A; el nuevo virus se denominó virus de la gripe B [1]. Las manifestaciones clínicas de la gripe B son generalmente indistinguible de las causadas por la gripe A. Globalmente la gripe B se presenta de forma bianual, casi siempre posterior a la onda epidémica de la gripe A, y representa alrededor del 25-30% de todos los casos de gripe comunicados a nivel global, aunque su porcentaje oscila según las epidemias y las zonas geográficas consideradas [2-5].

Una de las principales características diferenciales de los virus gripales B es que el ser humano es su único reservorio natural y por ello existe la posibilidad de que pueda ser eliminado mediante programas intensivos y efectivos de vacunación universal [2-5]. Sin embargo, en 1999 se detectó en Holanda un brote de gripe B que afectó a cetáceos marinos (focas), comprobándose que la cepa humana ya se había introducido en esta población animal en 1995 [6]. De este modo, aunque la circulación endémica de la gripe B está restringida a los humanos, se observa de forma esporádica paso de cepas a otras especies animales; sin embargo no existe ninguna evidencia de un reservorio animal sostenible para los virus gripales B [7]. Esta restricción de huésped podría atribuirse, al menos en parte, a las interacciones humanas específicas de las proteínas NS1 y M1 [8,9].

El virus gripal B pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y al género *Influenzavirus B*. Presenta un genoma de tipo ARN negativo formado por unos 14.648 nucleótidos divididos en ocho segmentos distintos que codifican unas 11 proteínas (no codifica las proteínas PB1-F2 y PA-X presentes en el virus gripal A), siendo la nucleoproteína B (NB) de su exclusividad [5,10] (Figura 1). La evolución genética de los virus gripales B es inferior a la observada en las cepas de la gripe A; así se ha calculado que la tasa de sustitución de nucleótidos en cada segmento genético por año es de  $0.14 \times 10^{-3}$ - $3.32 \times 10^{-5}$  en la gripe B frente a valores de  $2.68 \times 10^{-3}$ - $12.5 \times 10^{-3}$  en el subtipo (H3N2) de la gripe A [11-13].

Antes de 1980 todos los virus de la gripe B pertenecían a un único linaje genético; pero en este año emergieron dos linajes antigénica y genéticamente distintos que cocircularon por todo el mundo. Estos linajes se denominaron B/Victoria/2/1987 y B/Yamagata/16/1988 (Tabla 1) [14-16]. El linaje Yamagata divergió en el año 2.000 dando lugar a 2 clados antigénicamente diferentes (clados 2 y 3) que cocirculan en la actualidad, exhibiendo patrones de alternancia antigénica en cada estación epidémica. Por su parte el linaje Victoria también presentó un proceso de divergencia mas tardío, año 2011, dando lugar a dos clados monofiléticos (clados 1A y 1B) dominantes [17-19].

Se han podido demostrar procesos de intercambio genético (reasortamiento) intralinajes y entrelinajes; de ellos los mas frecuentes son aquellos en los que el linaje Victoria adquiere

	Segmento genómico	Proteínas
1	PB1	Proteína Básica 1
2	PB2	Proteína Básica 2
3	PA	Proteína Ácida
4	HA	Hemaglutinina
5	NP	Nucleoproteína
6	NB	Neuraminidasa
7	M1/BM2	Proteína de Matriz
8	NS1/NEP	Proteína no estructural Proteína exportación nuclear

**Figura 1** Representación esquemática de los segmentos genómicos y sus correspondientes proteínas del virus gripal B.

genes del linaje Yamagata [13]. De esta forma sólo los segmentos PB1, PB2 y hemaglutinina (HA) se siguen manteniendo separados entre los dos linajes. Por el contrario, los segmentos NS1/NS2 de las cepas actuales derivan todos del linaje Victoria y el resto de segmentos (PA, NP, NA/NB, M1/BM2) derivan del linaje Yamagata [13,20]. Todo ello ha determinado que las cepas del linaje Yamagata sean genéticamente mas estables y conservadas, muestren menores derivas antigénicas y una menor selección evolutiva, en comparación con las rápidamente cambiantes cepas del linaje Victoria [5,13].

Los análisis filodinámicos de la HA del linaje Victoria han mostrado una población sometida a una elevada presión selectiva que le permite escapar de la inmunidad humana a través de la adquisición de sustituciones beneficiosas en este gen. De este modo se constituyen de forma continua cepas nuevas con capacidad para infectar tanto a los vacunados como a los previamente infectados, aumentando el espectro infectivo de las mismas [13]. En el caso del linaje Yamagata, se ha observado una población viral con una dinámica evolutiva mucho menor, lo que se debería a una menor presión selectiva de escape y por ello una menor deriva antigénica [13,17,18].

En la gripe B cada cluster de cepas antigénicamente dominantes tiene tan solo una presencia transitoria, existiendo durante un corto período de tiempo antes que sea reemplazado por otro grupo nuevo. Este proceso, que podría ser equivalente a la deriva antigénica de la gripe A, se constituye como un proceso de selección dirigido, como se muestra en la elevada tasa de cambios en la HA (incluyendo mutaciones no sinónimas) y en la identificación directa de un importante número de posiciones que experimentan esta selección positiva. Como consecuencia de ello, la selección inmune en la HA y quizás en

**Tabla 1** Principales características diferenciales entre los dos linajes de los virus gripales B.

Característica	Victoria	Yamagata
Distribución por edades	Jóvenes	Adultos
Diversidad genética	Importantes cambios estacionales	Escasos cambios
Contagiosidad (Re)	Alta (1.13-1.27)	Baja (1.08-1.14)
Selección positiva	Intensa	Escasa
Deriva antigénica	Importante	Ocasional
Reasortamiento	Alto inter-linajes y baja intra-linajes	Baja inter-linajes y alta intra-linajes
Receptor celular preferente	$\alpha$ -2,3 y $\alpha$ -2,6 ácido siálico	$\alpha$ -2,6 ácido siálico

(Re) número reproductivo efectivo. Modificado de Vijaykrishna et al. [13]

las proteínas NB y NS, desempeña un papel primordial en la determinación del patrón de cambios evolutivos en las cepas de la gripe B [12].

La importancia de esta selección inmune se refleja en la alternancia en la circulación de los dos linajes. De este modo el linaje Victoria fue el predominante en el período 1987-1989 y el Yamagata durante la mayoría de los 90s. Este patrón de alternancia es compatible con el modelo que predice que un linaje predomina en la población viral hasta que la inmunidad de grupo dirigida contra él, ya sea obtenida por infección o vacunación, sea mayoritaria en la población, a partir de ese momento el otro linaje empieza a incrementar su presencia y dominancia pasando a ser dominante en poco tiempo [12]. De este modo los patrones y procesos de cambio evolutivo en la gripe B no sólo vienen determinados por la naturaleza de su interacción con el sistema inmune humano, sino que además reflejan de que modo los dos linajes interactúan entre ellos y con la propia gripe A [13,14].

Se ha propuesto que las diferencias en las dinámicas evolutivas y epidemiológicas de los dos linajes se deban a las diferentes preferencias de unión de la HA gripal al receptor celular [13]. Así el linaje Victoria ha mostrado capacidad para unirse a los receptores celulares con restos de ácido siálico en las posiciones  $\alpha$ -2,3 (aviar) y  $\alpha$ -2,6 (humano); mientras que el linaje Yamagata lo hace exclusivamente en las posiciones humanas  $\alpha$ -2,6 del tracto respiratorio [21,22]. Estudios experimentales realizados en niños menores de 7 años han mostrado que las células de su tracto respiratorio expresan preferentemente los residuos  $\alpha$ -2,3 y a menor nivel los de tipo  $\alpha$ -2,6 y a medida que se hacen adultos se produce el viraje y el predominio de los  $\alpha$ -2,6 en la población adulta; estos datos explicarían, entre otras situaciones, el predominio del linaje Victoria en la infancia y el Yamagata en los adultos de mayor edad; es decir la diferente distribución por edad de los dos linajes de la gripe B [13,23].

Estudios previos realizados en los virus gripales A han mostrado la existencia de una impronta inmunológica frente al primer subtipo de HA, de modo que las respuestas posteriores dependerán de esta primera respuesta [24]. Vieira et al. [25]

han comprobado que este mismo fenómeno se produce entre los dos linajes de la gripe B. Las HA y neuraminidasa (NB) de los virus gripales B evolucionan mucho mas lentamente entre los linajes que entre los diferentes subtipos de la gripe A. Además, los epítomos conservados en cada linaje pero variables entre ellos, podrían ser la base de la protección por impronta inmune frente al linaje Yamagata. Mientras que esta impronta frente al linaje Yamagata podrían afectar a la distribución etaria de los pacientes, la no inducción de esta impronta frente al linaje Victoria, podría explicar la casi constante presencia del mismo en cada temporada, aunque a niveles variables en ellas [13,25-26].

Se ha postulado que los anticuerpos inducidos por una primera infección por el linaje Yamagata podrían actuar sobre epítomos que están mas conservados que los epítomos neutralizados por los anticuerpos inducidos por la infección por el linaje Victoria. Por ello la protección inducida por el linaje Yamagata frente al linaje Victoria es débil y no duradera; el linaje Yamagata a menudo induce bajos o indetectables niveles de anticuerpos frente a la HA del linaje Victoria. Sin embargo, la primoinfección por el linaje Victoria induce anticuerpos capaces de inhibir intensamente la HA del linaje Yamagata, sugiriendo que el linaje Victoria podría proteger la infección posterior por el linaje Yamagata, independientemente de la edad del paciente [26,27]. Esta protección parece sólo obtenerse a través de los anticuerpos frente a la HA, ya que se observó que la adquisición del gen de la NB por parte del linaje Victoria en la temporada 2000-2001, no aportaba protección frente a la cepa reasortante formada; este hecho implica que la protección no se obtiene con los anticuerpos anti-NB [28,29].

La aparición de la pandemia causada por SARS-CoV-2 y la aplicación de diversas medidas sociales e higiénicas ha determinado la no circulación de la mayoría de los virus respiratorios convencionales. Entre ellos se ha detectado una casi desaparición de los virus gripales y del VRS; así a partir de abril de 2020 se produjo una reducción del 99% de las detecciones gripales. Esta disminución se acompañó de la correspondiente disminución de la diversidad genética de todos los virus gripales [30].

Esta escasa circulación podría haber contribuido a la elimi-

nación ("extinción") temporal del linaje Yamagata de la gripe B, ya que desde ese mes apenas se han comunicado detecciones de este linaje [30]. Aunque debe mencionarse que se ha observado que los virus gripales B entran periódicamente en un estado "durmiente" durante intervalos prolongados. Así durante los años 90 el linaje Victoria prácticamente dejó de circular, excepto por un brote detectado en África, pero fue dominante a nivel global desde principios del año 2000 [5,23].

La disminución en la prevalencia global del linaje Yamagata podría indicar una mayor vulnerabilidad y una pérdida progresiva de la capacidad de adaptación al huésped humano. Este linaje presenta un índice de reproductividad efectivo (Re) menor (Tabla 1) que el linaje Victoria, de modo que las epidemias causadas por el linaje Yamagata presentan una fase de crecimiento lento y una transmisión de corta duración. Este aspecto le hace a este linaje mucho más vulnerable a los factores que dificultan su transmisión, como las medidas adoptadas para contener la expansión del SARS-CoV-2 [13].

Los patrones de circulación global de los virus gripales se han asociado con los patrones etarios de la propia infección. Tal y como se ha mencionado el linaje Yamagata afecta preferentemente a la población adulta mayor de 25 años, que como consecuencia de la pandemia ha viajado poco en los últimos 18 meses, no permitiendo la libre circulación y la expansión del mismo. Pero no sólo el comportamiento humano podría ser el responsable de esta drástica reducción en la detección del linaje Yamagata, sino que el propio virus parece haberse estancado genéticamente. De este modo desde 2017 la casi totalidad de las cepas de este linaje pertenecen al clado 3A, cuando con anterioridad se detectaban clados múltiples circulando [17,19]. Aunque este clado 3A es diverso a nivel genético y ha adquirido mutaciones sustitutivas en el gen de la HA, éstas no han determinado cambios antigénicos significativos que hayan obligado a sustituir su componente antigénico (B/Pukhet/3073/2013) en la vacuna gripal desde 2015 [30].

La irrupción de la pandemia del SARS-CoV-2 coincidiendo con un período de baja incidencia y baja diversidad antigénica, junto a la efectividad vacunal de los últimos años, podría haber favorecido la desaparición o eliminación, quizás no extinción, del linaje Yamagata de la gripe B al menos la durante la pandemia. Con la disminución de la circulación del nuevo coronavirus y la reaparición de los otros virus respiratorios, podremos comprobar si esta desaparición es sólo temporal o definitiva en base a la vigilancia activa tanto virológica como epidemiológica.

## FINANCIACIÓN

El autor declara no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

## CONFLICTO DE INTERESES

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses

## BIBLIOGRAFÍA

1. Francis T. A new type of virus from epidemic influenza. *Science* 1940; 92:405-8. doi:10.1126/Science.92.2392.405.
2. Neumann G, Treanor JJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. En: Howley PM, Knipe DM (eds.). *Fields Virology* (Vol.1)(7th edition). Wolters Kluwer, Philadelphia. 2021, p.649-705.
3. Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J. The burden of influenza B: a structural literature review. *Am J Public Health* 2013; 103:e43-e51. doi:10.2105/AJPH.2012.301137.
4. Pumarola T, Antón A. Clínica y patogenia de la gripe. En: Ortiz de Lejarazu R (ed). *Amazing Books*, Zaragoza. 2019, p.107-18.
5. Koutsakos M, Nguyen TH, Barclay WS, Kedzierska K. Knowns and unknowns of influenza B. *Future Microbiol* 2016; 11:119-35. doi:10.2217/fmb.15.120.
6. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science* 2000; 288:1051-3. doi:10.1126/science.288.5468.1051.
7. Bodewes R, van de Bildt MW, van Elk CE, Schürch AC, Tordo N, Kuiken T et al. No serological evidence that harbour porpoises are additional hosts of influenza B viruses. *PLoS One* 2014; 9:e89058. doi:10.1371/journal.pone.0089058.
8. Guan R, Ma LC, Leonard PG, Brendan R, Amer BR, Sridharan H, Zhao C et. Structural basis for the sequence-specific recognition of human ISG15 by the NS1 protein of influenza B virus. *PNAS USA* 2011; 108:13468-73. Doi:10.1073/pnas.1107032108.
9. McCullers JA, Hoffmann E, Huber VC, Nickerson AD. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B confers mouse adaptation and virulence. *Virology* 2005; 336:318-26. Doi:10.1016/j.virol.2005.03.028.
10. Krammer F, Palese P. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. En: Howley PM, Knipe DM (eds.). *Fields Virology* (Vol.1)(7th edition). Wolters Kluwer, Philadelphia. 2021, p.596-648.
11. Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Taylor J, George KS et al. Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza virus. *PLoS Pathog* 2006; 2:e125. doi:10.1371/journal.ppat.0020125.
12. Chen R, Holmes EC. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J Mol Evol* 2008; 66:655-63. doi:10.1007/s00239-008-9119-z.
13. Vijaykrishna D, Holmes EC, Joseph U, Fourment M, Su YC, Halpin R et al. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *eLife* 2015; 4:e05055. doi:10.7554/eLife.05055.
14. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Co-circulation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* 1990, 175:59-68. doi:10.1016/0042-6822(90)90186-u.
15. McCullers JA, Saito T, Iverson AR. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J Virol* 2004; 78:12817-28. doi:10.1128/JVI.78.23.12817-12828.2004.
16. Kanegae Y, Sugita S, Endo A, Ishida M, Senya S, Osako K et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses

- isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J Virol* 1990; 64:2860-5. doi:10.1128/JVI.64.6.2860-2865.1990.
17. Virk RK, Jayakumar J, Mendenhall IH, Moorthy M, Lam P, Linster M et al. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *PNAS* 2020; 117:619-28. doi:10.1073/pnas.1916585116.
  18. Caini S, Kuszniarz G, Garate VV, Wangchuck S, Thapa B, de Paula FJ et al. The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century. *PLOS ONE* 2019. doi:10.1371/journal.pone.0222381.
  19. Langat P, Raghwan J, Dudas G, Bowden TA, Edwards S, Gall A et al. Genome-wide evolutionary dynamics of influenza B viruses on a global scale. *PLOS Pathogens* 2017. doi:10.1371/journal.ppat.1006749.
  20. McCullers JA, Saito T, Iverson AR. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J Virol* 2004; 78:12817-28. doi:10.1128/JVI.78.23.12817-12828.2004.
  21. Wang YF, Chang CF, Chi CY, Wang HC, Wang JR, Su JJ. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features. *J Med Virol* 2012; 84:679-85. doi:10.1002/jmv.23219.
  22. Velkov T. The specificity of the influenza B virus hemagglutinin receptor binding pocket: what does it bind to?. *J Mol Recognition* 2013; 26:439-49. doi:10.1002/jmr.2293.
  23. Nichols JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Resp Res* 2007; 8:73. doi:10.1186/1465-9921-8-73.
  24. Gostic KM, Bridge R, Brady S, Viboud C, Worobey M, Lloyd-Smith JO. Childhood immune imprinting to influenza shapes birth year-specific risk during seasonal H1N1 and H3N2 epidemics. *PLoS Pathog* 2019; 15:e1008109. doi:10.1371/journal.ppat.1008109.
  25. Vieira MC, Donato CM, Arevalo P, Rimmelzwaan GF, Wood T, Lopez L et al. Lineage-specific protection and immune imprinting shape the age distributions of influenza B cases. *Nature Communications* 2021; 12:4313. doi:10.1038/s41467-021-24566-y.
  26. Bedford T, Suchard MA, Lemey P, Dudas G, Gregory V, Hay AJ et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife* 2014; 3:e01914. doi:10.7554/eLife.01914.
  27. Skowronski DM, Hottes TS, De Serres G, Ward BJ, Janjua NZ, Saibaiduc S et al. Influenza B/Victoria antigen induces strong recall of B/Yamagata but lower B/Victoria response in children primed with two doses of B/Yamagata. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:833-9. doi:10.1097/INF.0b013e31822db-4dc.
  28. Skowronski DM, Hamelin ME, Janjua NZ, Serres G, Gardy JL, Rheume C et al. Cross-lineage influenza B and heterologous influenza A antibody responses in vaccinated mice: immunological interactions and B/Yamagata dominance. *PLoS One* 2012; 7:e38929. doi:10.1371/journal.pone.0038929.
  29. Laurie KL, Horman W, Carolan LA, Chan KF, Layton D, Bean A et al. Evidence for viral interference and cross-reactive protective immunity between influenza B virus lineages. *J Infect Dis* 2018; 30:548-59. doi:10.1093/infdis/jix509.
  30. Koutsakos M, Wheatley AK, Laurie K, Kent SJ, Rockman S. Influenza lineage extinction during the COVID-19 pandemic?. *Nature Rev* 2021. doi:10.1038/s41579-021-00642-4.