



**AVES MIGRATORIAS: SU ROL EN LA INTRODUCCIÓN Y
PRESENCIA DE INFLUENZA A Y CORONAVIRUS AVIAR EN LA
FAUNA ANTÁRTICA CHILENA**

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

Francisco Nicolás Verdugo Leal

Director de Memoria:

Gonzalo Andrés Barriga Pinto

Profesor patrocinante:

Sergio Álvarez Armijo

**Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad
de Medicina de la Universidad de Chile**

Santiago, Chile, 2022

Esta Memoria de Título fue realizada dentro del Programa de Virología ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada por el Proyecto FONDECYT 11200228 y el proyecto regular INACH RT3519 liderado por el Dr. Gonzalo Barriga Pinto.

*“Cuando te inclinas hacia lo que crees que te debes
esconder, ahí es donde encuentras tu libertad...”*

Joy Clark

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi madre María Elina Leal Pastene, la cual fue uno de los pilares fundamentales dentro de este periodo universitario. Su amor, resiliencia y búsqueda constante del conocimiento han podido trascender y moldear a la persona en la que soy hoy en día. Junto con mis hermanos, esperamos poder replicar su legado hacia las nuevas generaciones. Te amo Mamá.

A mi padre Francisco Aquiles Verdugo Neira, y hermanos María Francisca, Gonzalo y Felipe. A pesar de estar distanciados geográficamente y que nuestros caminos se encuentren separados, siempre hallamos la manera de volver a reconectarnos y hallar la manera de fortalecer nuestros lazos.

A mis queridos sobrinos Vicente, Sofia, Sara y Zibeth. La alegría que transmiten sus sonrisas, carcajadas e inocencia me inspiran constantemente a luchar por construir un mundo mejor y una sociedad más justa para ellos.

A mi amigo Bruno Contreras, que ha sido mi compañero más longevo dentro de este periodo de mi vida. Hemos compartido una infinidad de experiencias, risas, frustraciones y aprendizajes, en donde puedo decir que literalmente que ‘estuvimos en las buenas y en las malas’. Te quiero Bruno.

A mi fonoaudióloga y terapeuta Camila Paillao, la cual me ha ayudado durante este último tiempo a reconocer que el respeto hacia uno mismo, la libertad y la comodidad individual son valores intransables.

A la familia Pérez, en especial a mi tía Patricia Pastene y prima Karla Pérez, las cuales me brindaron apoyo, calidez de hogar y ayuda en mi estancia en Santiago mientras realizaba mi carrera.

Al Dr. Gonzalo Barriga Pinto por poder recibirme en su laboratorio, por su paciencia, su contagiosa dedicación y todo el apoyo y guía que ofreció al momento de escribir esta Memoria.

Y finalmente a mis compañeros de laboratorio Loreto, Johana y Gabriel. Por compartir nuestra primera experiencia en un laboratorio de investigación, donde pudimos compartir los muchos altibajos que implican trabajar dentro del mundo de la investigación y hacernos compañía emocional durante aquel año de dura pandemia.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA MEMORIA DE

TÍTULO

Gabriel Zamora, Johana Loncopan, Loreto Araos, Sebastian Aguilar, **Francisco Verdugo**, Cecilia Rojas-Fuentes, Lucas Krüger, Aldo Gaggero, and Gonzalo Barriga. (2022). "Scavengers as a sentinel for viral diversity: the Snowy sheathbill virome as a tool for monitoring virus introduction/circulation in Antarctica". Microbiology Spectrum (Enviada).

1. ÍNDICE GENERAL

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA MEMORIA DE TÍTULO	v
1. ÍNDICE GENERAL	vi
2. ÍNDICE DE TABLAS	viii
3. ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
4. ABREVIATURAS	xi
5. RESUMEN.....	xiii
6. SUMMARY	xv
7. INTRODUCCIÓN.....	1
7.1 Virus emergentes con genoma ARN	2
7.2 Aves como reservorios virales	2
7.3 Influenza A	4
7.4 Coronavirus aviar	6
7.5 Ecología viral en la fauna antártica	8
7.6 Hipótesis	13
7.7 Objetivo General:	13
7.8 Objetivos específicos:	13
8. METODOLOGÍA.....	14
8.1 Recolección y preparación de muestras ambientales	14
8.2 Procesamiento de muestras.....	15
8.3 Obtención de huevos embrionados.....	15
8.4 Inoculación e incubación de huevos	16
8.5 Cosecha de líquido alantoideo	16
8.6 Extracción de material genético	17
8.7 Cuantificación de material genético.....	17
8.8 Partidores.....	18
8.9 RT-PCR convencional y en tiempo real	18
Partidores infA	18
Partidores SVIP-MP	19
Partidores Opti1	19

Partidores Cor.....	20
Partidores IZS.....	20
8.10 Electroforesis en gel de agarosa.....	21
8.11 Inoculaciones en huevos embrionados.....	21
8.12 Preparación y enriquecimiento viral de muestras.....	22
8.13 Preparación de bibliotecas y secuenciación.....	23
8.14 Análisis bioinformático.....	23
8.15 Flujo de trabajo.....	23
9. RESULTADOS.....	25
9.1 Obtención de muestras ambientales.....	25
9.2 Presencia de CA en muestras ambientales.....	26
9.3 Presencia de VIA en muestras ambientales.....	30
9.4 Detección metagenómica viral en muestras de <i>Chionis albus</i>	35
10. DISCUSIÓN.....	37
10.1 Presencia de coronavirus aviar en muestras ambientales.....	37
10.2 Presencia de Influenza A en muestras ambientales.....	38
10.3 Detección metagenómica de virus mediante NGS.....	39
10.4 Variables bióticas y abióticas presentes en la recolección de muestras..	42
10.5 Limitaciones experimentales.....	44
11. CONCLUSIONES.....	46
12. REFERENCIAS.....	47
13. APÉNDICE.....	51

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de los VIA que han sido detectados en aves pertenecientes a la península antártica.....	10
Tabla 2: Resumen de las m.a. recolectadas en Punta Armonía, Isla Nelson.....	15
Tabla 3: Partidores utilizados en esta Memoria de Título.....	18
Tabla 4: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-qPCR usando los partidores infA y su programa de temperatura asociado.....	19
Tabla 5: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores SVIP-MP y su programa de temperatura asociado.....	19
Tabla 6: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores Opti1 y su programa de temperatura asociado.....	20
Tabla 7: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores Cor y su programa de temperatura asociado.....	21
Tabla 8: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores IZS y su programa de temperatura asociado.....	22
Tabla 9: Traspasos en huevos embrionados realizados en esta Memoria de Título.....	22

3. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Resumen esquemático del marco de análisis de los virus emergentes.....	1
Figura 2: Esquema de estructura y transmisión de VIA.....	4
Figura 3: Esquema de estructura y transmisión de CA.....	7
Figura 4: Comparación de secuencias genómicas y proteicas almacenadas según continente.....	9
Figura 5: Mapa esquematizado de los VIA y CA detectados e identificados en aves acuáticas en la península antártica.....	11
Figura 6: Diagrama de flujo de experimentos realizados en el presente trabajo, con el fin de establecer la presencia de VIA y CA en m.a. antárticas.....	24
Figura 7: Mapa del litoral de Punta Armonía, Isla Nelson.....	25
Figura 8: Detección de CA en grupos 1-25 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv.....	27
Figura 9: Detección de CA en primer traspaso de grupos 1-14 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv.....	27
Figura 10: Detección de CA en primer traspaso de grupos 15-25 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv.....	28
Figura 11: Detección de CA en grupo 5 mediante RT-PCR utilizando partidores IZS Fw/Rv.....	28
Figura 12: Detección de CA en muestras individuales de grupos 6, 7, 10, 13, 21, 22, 23 y 24 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv.....	29
Figura 13: Detección de CA en muestras individuales de grupo 5 mediante RT-PCR utilizando partidores IZS Fw/Rv.....	29
Figura 14: Detección de CA en muestras individuales de grupo 5 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv.....	30
Figura 15: Detección de VIA en grupos (1-25) mediante RT-PCR utilizando partidores Opti1.....	31
Figura 16. Detección de VIA en grupos 1-7 mediante RT-PCR utilizando partidores SVIP-MP.....	32
Figura 17. Detección de VIA en primer traspaso de grupo 7 mediante RT-PCR utilizando partidores SVIP-MP.....	32
Figura 18: Detección de VIA en segundo (t2) y tercer traspaso (t3) de grupo 7 mediante RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv.....	33

Figura 19: Detección de VIA en muestras individuales del grupo 7 por RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv.....	33
Figura 20. Detección de VIA en primer (t1) y segundo traspaso (t2) de muestras individuales del grupo 7 mediante RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv.....	34
Figura 21: Detección de VIA en grupos 17 y 25 mediante RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv.....	35
Figura 22: Abundancia absoluta de las familias virales presentes en muestras obtenidas de <i>Chionis albus</i>	36
Figura 23: Representación de la diversidad del viroma encontrado en muestras de <i>Chionis albus</i> obtenidas en ECA57.....	42

4. ABREVIATURAS

°C:	Grados Celsius
CA:	Coronavirus aviar
Ct:	Umbral de ciclos (<i>Cycle threshold</i>)
DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DTT:	Ditiotreitol
ECA57:	Expedición Antártica Chilena 57
Fw:	<i>Forward</i>
<i>g</i> :	Aceleración gravitacional
h:	Horas
kb:	Kilobases
m.a.:	Muestras ambientales
mL:	Mililitros
MTV:	Medio de transporte viral
NGS:	<i>Next Generation Sequencing</i> , secuenciación por nueva generación
nm:	Nanómetros
ORF1ab:	Marco de lectura abierto 1ab
t1:	Primer traspaso en huevo embrionado
t2:	Segundo traspaso en huevo embrionado
t3:	Tercer traspaso en huevo embrionado
pb:	Pares de bases
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
RdRp:	ARN polimerasa dependiente de ARN
RT:	Retrotranscriptasa
RT-PCR:	Reacción en cadena de polimerasa asociado a retrotranscripción
RT-qPCR:	Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real asociado a retrotranscripción
Rv:	<i>Reverse</i>

TAE:	Tampón Tris-acetato-EDTA
V:	Volts
VIA:	Virus Influenza A
µg:	Microgramos
µL:	Microlitros
µM:	Micromolar

5. RESUMEN

Diversos virus emergentes de orígenes zoonóticos han surgido este último tiempo. Dentro de los más importantes tenemos al virus Influenza A y diferentes coronavirus. Un reservorio para virus de estos géneros son las aves voladoras. A pesar que existen diversos estudios de vigilancia sobre estos virus, se posee poca información sobre su ecología en el continente antártico, lugar donde existe una fauna única en el mundo. Las aves migratorias poseen un rol fundamental en la introducción y presencia de estos virus. Postulamos que estas aves son posibles vectores para la diseminación viral entre el cono sur y el continente antártico. De esta forma, con el fin de diagnosticar posibles infecciones virales emergentes o reemergentes nos propusimos realizar un “*screening*” para Influenza A y coronavirus aviar en las 124 muestras ambientales obtenidas en el estudio de vigilancia realizado en 2020 durante la Expedición Antártica Chilena 57 (ECA57). De manera paralela se utilizó huevos embrionados de gallina con el fin de aislar estos virus y así poder caracterizar más adelante estos patógenos. Por otra parte, utilizando herramientas de NGS, se propuso realizar ensayos metagenómicos para determinar la diversidad viral, utilizando al migrador carroñero *Chionis albus* como hospedero.

Nuestros resultados mostraron la posible presencia de Influenza A en dos muestras, sin embargo, ambas muestras no lograron ser adaptadas a huevo embrionado para su aislamiento. Además, nuestros resultados también indican la presencia de coronavirus aviar en el grupo 5, la cual logró ser adaptada a huevo embrionado. Por otra parte, a partir de los resultados de NGS, se obtuvieron 118 *contigs* asociados

a especies virales ya descritas previamente en la naturaleza, indicando la riqueza y diversidad viral que poseen las muestras de un carroñero como *Chionis albus*.

En conjunto, estos resultados sugieren que existe la presencia de Influenza A y coronavirus aviar dentro de las 124 muestras ambientales. Además, existe una diversidad viral importante dentro de la especie *Chionis albus*, la cual indica su rol como vector, reservorio y transportador de virus emergentes.

6. SUMMARY

“Migratory birds: their role in the introduction and presence of emerging viruses in Chilean Antarctic avian wildlife”

Several emerging viruses of zoonotic origin have emerged recently. Among the most important are Influenza A virus and different coronaviruses. One reservoir for viruses of these genera is flying birds. Although there are several surveillance studies on the latter viruses, there is little information on their ecology on the Antarctic continent, where there is a unique fauna in the world. Migratory birds play a key role in the introduction and presence of these viruses. We postulate that these birds are possible vectors for viral dissemination between the southern cone and the Antarctic continent. Thus, in order to diagnose possible emerging or re-emerging viral infections, we set out a screening for Influenza A and avian coronavirus in 124 environmental samples obtained in the surveillance study carried out in 2020 during the Chilean Antarctic Expedition 57 (ECA57). In parallel, embryonated chicken eggs were used to isolate these viruses for further characterization of these pathogens. On the other hand, using NGS tools, we proposed to perform metagenomic assays to determine viral diversity, using the scavenging migrant *Chionis albus* as host.

Our results showed the possible presence of Influenza A in two samples, where both positive samples failed to be adapted to embryonated egg for isolation. In addition, our results also indicate the presence of avian coronavirus in group 5, which could be adapted to embryonated egg. Moreover, from the NGS results, 118 *contigs* associated with viral species previously described in nature were obtained,

indicating the richness and viral diversity of samples from a scavenger such as *Chionis albus*.

Taken together, these results suggest the presence of Influenza A and avian coronavirus within the 124 environmental samples. In addition, there is significant viral diversity within the *Chionis albus* species, indicating its role as a vector, reservoir and transporter of emerging viruses.

7. INTRODUCCIÓN

La globalización ha generado un gran aumento de la actividad humana, lo cual ha afectado directa e indirectamente el clima, los ecosistemas y la biodiversidad. Debido a esto es que ha surgido el concepto de 'One Health', el cual está definido como la colaboración multidisciplinar para obtener una salud óptima, tanto para las personas, animales y el entorno (de Macedo Couto & Brandespim, 2020). Uno de los enfoques de esta disciplina es la vigilancia de enfermedades infecciosas emergentes (EIE), las cuales se caracterizan por su reciente aparición durante las últimas décadas y que se espera sigan aumentando en el futuro cercano (García-Sastre & Richt, 2019).

Las EIE tienen orígenes zoonóticos; es decir, poseen la cualidad de transmitirse desde animales hacia humanos, convirtiendo a estos eventos en una constante amenaza tanto para la salud humana, como para la salud animal (Parrish et al., 2008). Dentro de los causantes de las EIE se encuentran los virus emergentes (VE), donde un reservorio a vigilar son las especies voladoras como murciélagos, aves e insectos (Nabi et al., 2021). Los VE se caracterizan por su repentina aparición en hábitats debido a cambios en el ecosistema local, pudiendo ser transportados accidentalmente a través de hospederos y traspasar las barreras humano-animales (Mourya et al., 2019)(**Figura 1**).



Figura 1: Resumen esquemático del marco de análisis de los virus emergentes. El aumento de la actividad humana en áreas silvestres, el movimiento de los animales salvajes hacia áreas de actividad humana y nuevas características de los virus adquiridas por mutaciones, son algunas de las características necesarias para la aparición de virus emergentes.

7.1 Virus emergentes con genoma ARN

Los virus, en particular los que poseen un genoma compuesto de ARN (denominados Riboviria), son los parásitos más abundantes del planeta y pueden afectar a un amplio grupo de organismos (ser humano, animales, plantas y bacterias) (Antunez, 2020). Este dominio viral posee la característica de presentar errores en la replicación del genoma, debido a factores como un ciclo replicativo rápido del virus, genomas pequeños y falta de capacidad correctora dentro de sus polimerasas, generando que tengan una alta tasa de mutación, evolución y divergencia (García-Sastre & Richt, 2019).

7.2 Aves como reservorios virales

Las aves son importantes hospederos y reservorios de patógenos con características zoonóticas a nivel mundial (Nabi et al., 2021). Su extensa población, gran biodiversidad de especies, sumado a sus rasgos ecológicos como la reunión y

agrupación durante la alimentación y el descanso, son factores que las convierten en reservorios de diversos patógenos (Nabi et al., 2021). La migración es una estrategia habitual de las aves que ocupan hábitats estacionales y puede abarcar desde breves desplazamientos locales hasta migraciones intercontinentales, conectando a casi todas las regiones de nuestro planeta gracias a sus ciclos anuales de migración (Bauer & Hoyer, 2014). Sus comportamientos migratorios de largas distancias les otorga la capacidad de transportar patógenos entre lugares muy distantes (Reed et al., 2003).

Las principales aves migratorias descritas comúnmente como reservorios de virus con genoma de ARN son las aves acuáticas del orden de los Charadriiformes (aves costeras) y las Anseriiformes (aves acuáticas) (Domańska-Blicharz et al., 2021). Estos órdenes comprenden un conjunto de aves biológicamente heterogéneas que se caracterizan por su tamaño pequeño, habitar en zonas cercanas a la costa y volar tanto en campo como en aguas abiertas. Debido a que habitan cerca del agua, se alimentan de invertebrados u otros animales pequeños. Están adaptadas a vivir en una gran variedad de ecosistemas terrestres y acuáticos, haciéndolas parte importante de la fauna de las costas en regiones árticas, hasta los océanos e islas ubicadas en el extremo del hemisferio sur (Endo & Nishiura, 2018).

A pesar que existe una mayor descripción de virus con genoma de ARN dentro de las aves de corral, las aves migratorias desempeñan un papel quizás aun mayor como hospederos y agentes de transmisión de virus ARN (Domańska-Blicharz et al., 2021). Dos virus que poseen mayor relevancia para la industria y para la

ecología viral son los virus Influenza A (VIA) y coronavirus aviar (CA) (Cavanagh, 2005; Nuñez & Ross, 2019).

7.3 Influenza A

El VIA pertenece a la familia Orthomyxoviridae, una familia de virus de nucleocápside con simetría helicoidal, que poseen genomas de ARN monocatenario de polaridad negativa, dividido en ocho segmentos (**Figura 2A**) (Thomas & Noppenberger, 2007). Los virus de esta familia se encuentran clasificados cuatro géneros: influenza A, B, C y D. Las aves acuáticas son la principal fuente de VIA, el cual también está extendido en humanos y cerdos (Riedel, 2006). El virus influenza B (VIB) y el virus influenza C (VIC) infectan principalmente a los humanos, y el virus influenza D (VID) infecta animales ganaderos como vacas y cerdos (Thomas & Noppenberger, 2007) (**Figura 2B**).

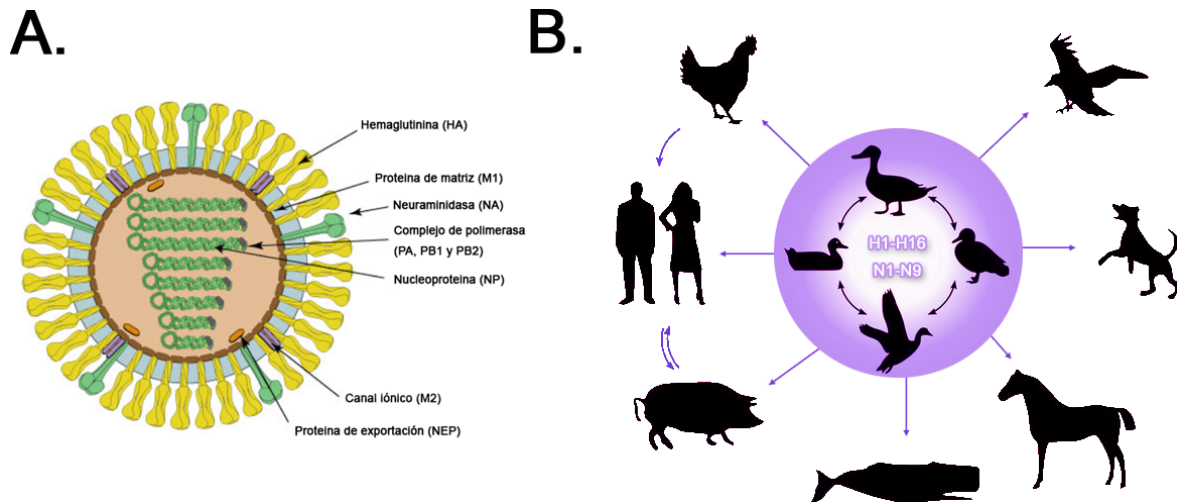


Figura 2: Esquema de estructura y transmisión de VIA. **A)** Influenza A posee un tamaño genómico de 13,5 kb. Los ocho segmentos del genoma del VIA codifican 10 proteínas: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), proteínas de la matriz M1 y M2, proteínas no estructurales (NS) NS1 y NS2, la nucleocápside (N) y las tres polimerasas, las proteínas PB1 (polimerasa básica 1), PB2 y PA (polimerasa ácida). Ilustración adaptada desde ViralZone. **B)** Ilustración esquemática de la transmisión entre especies del virus Influenza A. Los reservorios naturales de los Influenza A son las aves acuáticas silvestres, a partir de las cuales pueden transmitirse a una amplia variedad de otras especies. Ilustración adaptada (Ma et al., 2015).

Los VIA se subtipifican en función de los antígenos hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), que son proteínas de superficie que se encuentran en la envoltura viral. Hasta la fecha, se han descrito 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9) en aves y pueden encontrarse en múltiples combinaciones (Ma et al., 2015).

Dentro del proceso infeccioso de VIA, la proteína HA se une a los residuos de ácido siálico presentes en la superficie de las células del hospedero. Los residuos de ácido siálico de tipo α -2,6 se encuentran en células epiteliales del tracto superior del sistema respiratorio humano y los residuos de ácido siálico de tipo α -2,3 se encuentran en células epiteliales del intestino de aves y en tracto inferior del sistema respiratorio humano (Matrosovich et al., 1999).

Las aves silvestres son especies más comúnmente asociadas a VIA y generalmente se consideran reservorios naturales de este virus (Olsen et al., 2006), especialmente en los órdenes Anseriiformes (cercetas, patos, gansos y cisnes) y Charadriiformes (palomas, gaviotas y charranes). Ambos órdenes desempeñan un papel en la diseminación a corto plazo del virus a grandes distancias (Hanson et al., 2008; Olsen et al., 2006).

Los VIA circulan de manera endémica dentro y entre las aves migratorias, sin signos visibles de enfermedad, pero al entrar en el sistema de producción de aves de corral pueden volverse altamente virulentos causando tasas considerables de mortalidad (Graham et al., 2008). En el caso de enfermedades producidas por VIA en humanos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que estas infecciones provocan entre 250.000 y 500.000 muertes al año (Vemula et al., 2016) . En 1968 se introdujo

en la población humana un VIA de origen aviar del subtipo H3N2, que causó una pandemia asociada a más de un millón de muertes en todo el mundo (Alymova et al., 2016). Más recientemente, en 2009, una pandemia de gripe causada por una nueva cepa de H1N1 provocó millones de infecciones en más de 214 países (Yang et al., 2016).

7.4 Coronavirus aviar

Los coronavirus pertenecen a la familia de los Orthocoronavirinae, una subfamilia de virus de morfología esférica, que poseen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, no segmentado (**Figura 3A**) (Dharmayanti & Nurjanah, 2020). Se encuentran clasificados en cuatro géneros: Alphacoronavirus (α -CoV), Betacoronavirus (β -CoV), Gammacoronavirus (γ -CoV) y Deltacoronavirus (δ -CoV). El α -CoV y el β -CoV infectan a múltiples especies de mamíferos, incluyendo murciélagos, pangolines, camellos y humanos (**Figura 3B**). En cambio, los γ -CoV poseen su reservorio principalmente en aves voladoras, mientras que los δ -CoV se encuentran tanto en aves como en algunos mamíferos (Dharmayanti & Nurjanah, 2020).

Estos últimos dos géneros poseen una afinidad primaria por el sistema respiratorio de sus hospederos aviares, provocando una inflamación leve a grave en los epitelios nasales y traqueales de las aves (Ambepitiya Wickramasinghe et al., 2015); sin embargo, algunas de sus variantes poseen tropismo también por otros órganos como el sistema digestivo, los riñones, el oviducto, los testículos o las amígdalas (Milek & Blicharz-Domańska, 2018).

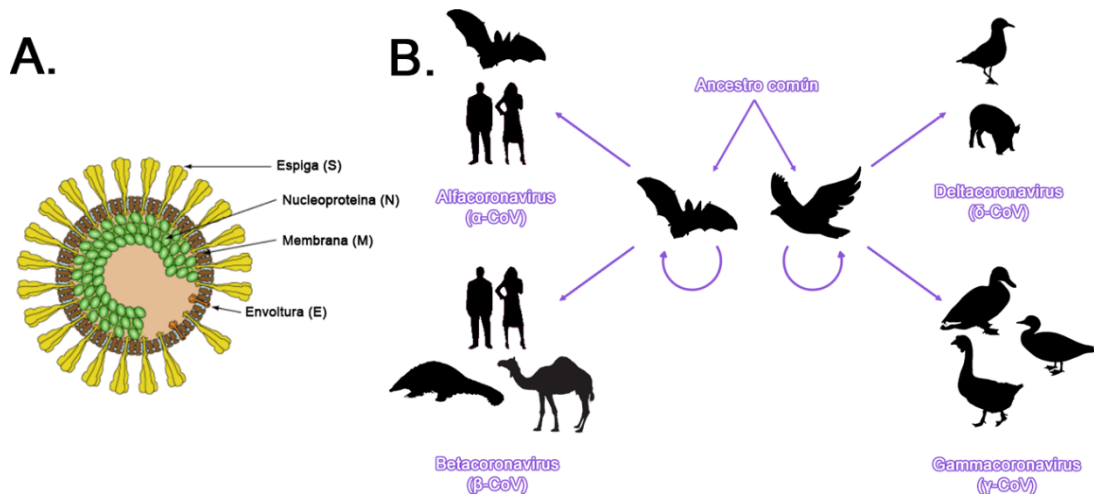


Figura 3: Esquema de estructura y transmisión de CA. **A)** El coronavirus es un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 27,6 kb. El genoma viral comprende un marco de lectura abierto (ORF) 1ab y 1b, que codifica 15 proteínas no estructurales (nsp2-16), entre ellas la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), la proteína de espiga S, la proteína de envoltura E, la proteína de membrana M y la proteína de nucleocápside N. Ilustración adaptada desde ViralZone. **B)** Ilustración esquemática de la transmisión entre especies de los coronavirus.

La proteína S actúa como proteína de unión a la célula hospedera, lo cual será determinante del tropismo tisular y, en consecuencia, de su patogenia. Esta proteína contiene dos subunidades: S1 y S2. La subunidad S1 media la adherencia del virus, mientras que la subunidad S2 inicia la fusión e internalización del virus en la célula hospedera (Ambepitiya Wickramasinghe et al., 2015). La unión por parte de la subunidad S1 está determinada por la molécula α -2,3 de AS presente en los tejidos del hospedero (Yuan & Wen, 2021).

Los CA se encuentran de manera ubicua dentro de las aves migratorias y se han detectado principalmente en aves acuáticas en la mayoría de los continentes del mundo (Wille & Holmes, 2020). Hasta el año 2020 se han identificado un total de 222 muestras positivas para γ -CoV y 55 muestras positivas para δ -CoV a partir de aves migratorias en diversos continentes: Europa, Asia, África, América del Norte, América del Sur, Australia e incluso la Antártica (Wille & Holmes, 2020). Dentro de

las aves de corral se ha detectado el virus de la bronquitis infecciosa (VBI), el cual es clasificado como un γ -CoV, y ha producido consecuencias económicas para la industria avícola en todo el mundo (Khataby et al., 2020).

La diversidad genética característica de los CA les permite adaptarse e infectar nuevos hospederos en cortos periodos de tiempo (Woo et al., 2009). Ejemplos de esto son los casos previos de brotes asociados a coronavirus, como el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y finalmente el 2019, la actual pandemia del COVID-19, causada por el SARS-CoV-2, la cual ha tenido efectos devastadores en la economía mundial y en la salud humana, llegando a 578.000.000 millones de casos documentados de infecciones y más de 6.400.000 de muertes asociadas a la enfermedad (World Health Organization, 2022).

7.5 Ecología viral en la fauna antártica

La Antártica e islas subantárticas proporcionan un entorno único para la coexistencia de una variedad de aves acuáticas y migratorias. Debido a su aislamiento geográfico, la introducción de patógenos a estas poblaciones de fauna puede tener efectos perjudiciales. Se tiende a pensar que la Antártica es un tipo de “callejón sin salida evolutivo” para los virus, por lo que la introducción de nuevos patógenos es un hecho poco común; sin embargo, una vez introducidas, pueden convertirse en endémicas dentro de la población local de aves (Hurt et al., 2016).

Si bien existen varios estudios de vigilancia de VIA y de CA alrededor del mundo, esto no ocurre para el continente antártico, lo que se demuestra/evidencia en la baja

cantidad de secuencias almacenadas en bases de datos (**Figura 4**) (Wille & Holmes, 2020).

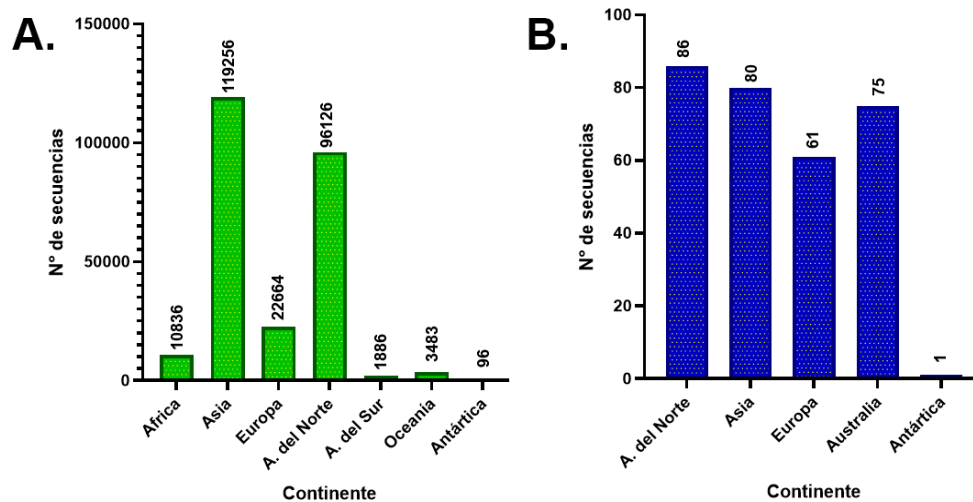


Figura 4: Comparación de secuencias genómicas y proteicas almacenadas según continente. **A)** Secuencias de proteína de Influenza A almacenadas según el continente donde está almacenada hasta la fecha. (Influenza Research Database, fludb.org) **B)** Secuencias de genomas coronavirus aviar aisladas, obtenidas desde aves silvestres migratorias. (Wille et al, 2020).

En los últimos diez años se ha puesto de manifiesto un mayor conocimiento de la diversidad vírica presente en la fauna antártica. Las primeras investigaciones sobre la salud de dicha fauna antártica basadas en ensayos serológicos, mostraron la exposición previa a virus ARN pertenecientes a las familias Birnaviridae, Flaviviridae, Orthomyxoviridae y Paramyxoviridae en aves como pingüinos, petreles y escúas (Smeele et al., 2018).

Durante la última década, se ha podido utilizar ensayos basados en PCR para el diagnóstico de virus en animales antárticos. Varios autores han contribuido con la detección e identificación de Influenza A en hospederos aviares dentro del continente antártico de manera anual (de Souza Petersen et al., 2017; Hurt et al., 2016; Neira et al., 2017; Seixas, 2016). Durante los últimos años se han detectado seis subtipos de VIA (**Tabla 1, Figura 5**), algunos de ellos en distintas épocas del

año, lo que sugiere que estos virus podrían ser introducidos a la fauna antártica por aves migratorias, o estar de manera endémica en la Antártica (Hurt et al., 2016).

Tabla 1: Resumen de los VIA que han sido detectados en aves pertenecientes a la península antártica.

Subtipo de influenza A detectado	Especimen	Muestras positivas/ Muestras totales	Año de muestreo	Ubicación	Referencia
H11N2	Pingüino Adelia (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	1/301	2013	Isla Rey Jorge (Bahía Almirantazgo)	Hurt et al., 2014
		7/301	2013	Isla Kopaitic (Rada Covadonga)	
H11	Paloma antártica (<i>Chionis albus</i>)	1/4*	2014	Isla Kopaitic (Rada Covadonga)	Hurt et al., 2016
H5N5	Pingüino barbijo (<i>Pygoscelis antarcticus</i>)	(1/493)	2015	Isla Rey Jorge (Punta Narębski)	Hurt et al., 2016
H5N5	Pingüino barbijo (<i>Pygoscelis antarcticus</i>)	8/513	2015-2016	Islas Aitcho	Barriga et al., 2016
	Pingüino papúa (<i>Pygoscelis papua</i>)	13/513			
H4N7	Petrel gigante (<i>Macronectes giganteus</i>)	1/299*	2009-2012	Isla Elefante (Punta Stinker)	de Souza Petersen et al., 2017
H6N8	Escúa polar (<i>Stercorarius maccormicki</i>)	13/615	2010-2013	Isla Elefante	Seixas et al., 2016

Se utilizaron herramientas moleculares y posteriormente fueron identificados mediante técnicas basadas en secuenciación. *: El virus no pudo ser aislado en huevo embrionado de gallina. Se secuenció desde la muestra directa.

Estudios enfocados en la vigilancia de CA en el continente antártico han sido escasos. De hecho, muy recientemente se detectó la primera especie de CA en la península antártica: una nueva especie de δ -CoV obtenido de pingüino papúa, ubicado en Isla Kopaitic, la cual fue encontrada realizando estudios metagenómicos, por lo que se cuenta con una secuencia genómica parcial (**Figura 5**) (Wille et al., 2020).

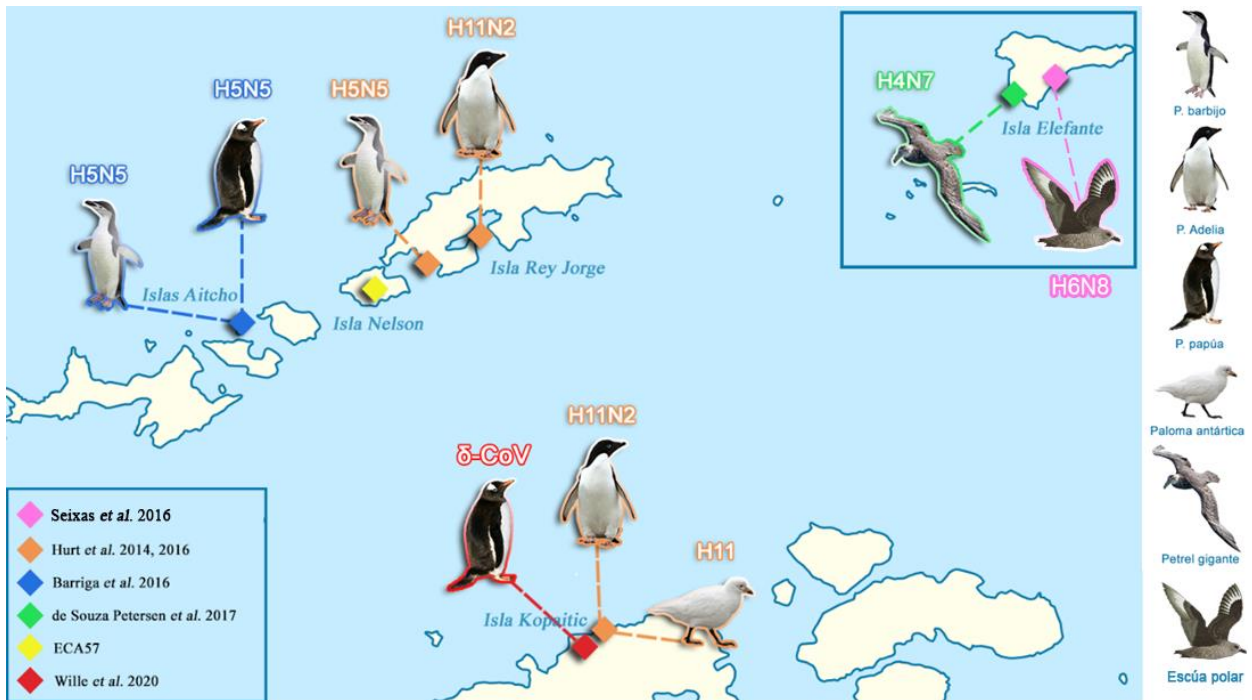


Figura 5: Mapa esquematizado de los VIA y CA detectados e identificados en aves acuáticas en la península antártica.

Tanto VIA como CA se caracterizan por su alta variabilidad genómica y su gran impacto a nivel ecológico, económico y sanitario. Comprender esta diversidad viral es fundamental para predecir futuros riesgos de transmisión o posibles brotes de enfermedades virales. Por lo expuesto anteriormente, este estudio de vigilancia se enfocó en detectar posibles VIA y CA presentes en la fauna antártica, con el fin de dar continuidad a los estudios de vigilancia previos realizados en la península antártica y cerrar los vacíos de información por la escasa información acumulada en estos años sobre ambos virus.

A pesar de que existan estudios de caracterización de VIA en especies como petrel gigante (de Souza Petersen et al., 2017) y escúa polar (Seixas, 2016), no existe hasta la fecha un estudio específico el cual caracterice virus provenientes de paloma

antártica (*Chionis albus*). Para responder a esto, utilizando estudios metagenómicos con herramientas de NGS, se identificó y caracterizó posibles nuevas especies virales presentes en muestras de *Chionis albus*, donde se obtuvo información genómica acerca de la diversidad viral presente en esta especie.

En conjunto, los resultados de este estudio complementan la información sobre la ecología viral dentro de la fauna perteneciente a la península antártica.

7.6 Hipótesis

“Las aves migratorias poseen un rol en la introducción y presencia de Influenza A y coronavirus aviar dentro de la fauna perteneciente a la antártica chilena”

7.7 Objetivo General:

Evaluar la presencia de Influenza A y coronavirus aviar en muestras obtenidas desde la fauna ubicada en la península antártica.

7.8 Objetivos específicos:

- I. Detectar la presencia de virus Influenza A en muestras ambientales obtenidas en Punta Armonía, Isla Nelson.

- II. Detectar la presencia de coronavirus aviar en muestras ambientales obtenidas en Punta Armonía, Isla Nelson.

- III. Determinar la diversidad viral presente en muestras cloacales de *Chionis albus*.

8. METODOLOGÍA

8.1 Recolección y preparación de muestras ambientales

Se realizó el estudio de vigilancia denominado Expedición Chilena Antártica 57 (ECA57) en la península antártica, en la localidad de Isla Nelson, específicamente en el litoral Punta Armonía (62°18'0" S, 59°13'0" W), el cual se realizó durante diciembre del año 2020. Entre los días 15 y 18 de diciembre del 2020, se recolectaron un total de 124 muestras ambientales (m.a.) desde la fauna antártica, 28 de las cuales se lograron identificar su hospedero procedente (**Tabla 2**), mientras que los 96 restantes fueron recolectados desde heces frescas encontradas en el suelo antártico. Estas muestras fueron enumeradas según su orden de recolección. En detalle, 12 fueron recolectadas desde petreles gigantes (*Macronectes giganteus*), 6 de paloma antártica (*Chionis albus*), 1 de cormorán (*Leucocarbo bransfieldensis*) y 9 de foca de Weddel (*Leptonychotes weddellii*) (**ver Apéndice**). Las 96 muestras obtenidas desde el suelo antártico se ubicaron dentro de colonias de pingüinos papúa y barbijo, junto a escúas y palomas antárticas. Las 124 muestras fueron recolectadas con hisopos estériles y fueron depositadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL con 500 µL de medio de transporte viral (MTV), el cual contenía DMEM, penicilina (800 µg/ml), anfotericina B (10 µg/ml) y glicerol (85%).

Tabla 2: Resumen de las muestras ambientales recolectadas en Punta Armonía, Isla Nelson.

Origen	Cantidad	Tipo de muestra	Muestras
Petrel gigante (<i>Macronectes giganteus</i>)	12	Vómito	77, 5, 41, 48, 45.1, 6, 16A, 16B, 24, 38, 53A, 60
Foca de Weddell (<i>Leptonychotes weddellii</i>)	9	Heces	57, 14, 8.1, 80.1, 97, 52.1, 78, 5, 23
Paloma antártica (<i>Chionis albus</i>)	6	Torulado cloacal	35, 66.1, 10, 33, 71, 25
Cormorán (<i>Leucocarbo bransfieldensis</i>)	1	Vómito	97.1
Sin hospedero identificado	96	Heces	-
Total	124		

Se obtuvieron 28 muestras directamente desde el hospedero, mientras que los 96 restantes se obtuvieron desde el suelo antártico, por lo tanto, no poseen hospedero identificado.

8.2 Procesamiento de muestras

Debido a la gran cantidad de muestras, y para optimizar recursos y tiempo, las 124 m.a. fueron reunidas en grupos de 5 muestras cada uno. Para esto se extrajo 50 μ L de cada muestra y se construyeron grupos con un volumen final de 250 μ L. Teniendo esto en consideración, se generaron finalmente 25 grupos, enumerados del 1 al 25 (ver Apéndice).

8.3 Obtención de huevos embrionados

Se utilizaron huevos embrionados de gallina, los cuales fueron inoculados con las muestras problema para la propagación y aislamiento de VIA y CA. Estos huevos fertilizados se obtuvieron de un aviario libre de patógenos pertenecientes al Instituto de Salud Pública (ISP). Estos huevos fueron previamente incubados entre 8-10 días, tiempo estimado en que todavía el embrión no alcanza a desarrollar su sistema inmune.

8.4 Inoculación e incubación de huevos

Se prepararon los huevos volteándolos con el extremo romo hacia arriba, y se etiquetaron con el nombre de la muestra a inocular. Dentro de una cámara de flujo laminar, se limpiaron los huevos con etanol al 70% para evitar contaminación. Se determinó utilizar una mezcla de 50 μ L de m.a. y 50 μ L de MTV por cada huevo a inocular. En los casos donde la muestra a inocular sea líquido alantoideo, se utilizó 100 μ L de este último y 100 μ L de MTV por cada huevo.

Para la inoculación se perforó un pequeño agujero en la cascara sobre el saco de aire. Utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL, se inoculó la muestra de interés dentro de la cavidad alantoidea, evitando el contacto de la aguja con el embrión de pollo o alguna arteria. Luego, se selló la perforación con silicona fría para evitar el ingreso de microorganismos externos. Finalmente, los huevos ya inoculados se transfirieron a una incubadora con ambiente húmedo a 37°C, donde se dejaron incubando por 48 horas.

8.5 Cosecha de líquido alantoideo

Luego de las 48 horas de incubación, se mantuvieron los huevos inoculados a 4°C por toda la noche. Al día siguiente, se llevaron los huevos embrionados a una cámara de flujo laminar y se rompió la cascara con unas pinzas estériles. Ocupando una pipeta Pasteur de 10 mL, se recuperó la máxima cantidad posible de líquido alantoideo desde cada huevo (en promedio se obtuvo 2-3 mL, por lo que se guardaron en dos tubos Eppendorf de 1,5 mL).

Nos referiremos a “traspaso” a la inoculación y posterior cosecha de líquido alantoideo obtenido desde un huevo embrionado inoculado con muestra problema.

Los líquidos alantoideos obtenidos se guardaron a -80°C hasta su próxima utilización.

8.6 Extracción de material genético

Se utilizaron dos sistemas comerciales para extraer material genético viral (ARN). Cuando se trabajó directamente sobre las m.a., se utilizó el sistema comercial “E.Z.N.A.® Total RNA Kit” (Omega Bio-Tek) según las indicaciones del fabricante. Cuando se trabajó sobre los líquidos alantoideos extraídos de huevos embrionados, se utilizó TRIzol® Reagent (ThermoFisher) según las indicaciones del fabricante. Las muestras de ARN se mantuvieron a -20°C.

8.7 Cuantificación de material genético

Para corroborar la concentración y pureza del ARN extraído desde la muestra de interés, se midió la absorbancia utilizando el espectrofotómetro EPOCH Take3. La concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se obtuvo mediante la ley de Lambert-Beer, donde se utilizó una longitud de onda (λ) de 260 [nm] para la obtención de absorbancia y así calcular la concentración de ARN de manera indirecta.

$$A(\lambda) = \epsilon cl$$

A: absorbancia; **ϵ** = coeficiente de extinción; **c**= concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$); **l**= longitud de cubeta

En el caso de la pureza, se utilizó la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, el cual es un indicador de la contaminación por proteínas.

8.8 Partidores

Los partidores fueron sintetizados en la empresa Integrated DNA Technologies Inc. (IDT). Las secuencias de los partidores se muestran dentro de la **Tabla 3**.

Tabla 3: Partidores utilizados en esta Memoria de Título.

Partidor	Secuencia 5'-3'
Cor Fw	ACW CAR HTV AAY YTN AAR TAY GC
Cor Rv	TCR CAY TTD GGR TAR TCC CA
IZS Fw	CDC AYG ART TYT GYT CNC ARC
IZS Rv	RHG GRT ANG CRT CWA TDG C
infA Fw	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
infA Rv	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA
Sonda infA	FAM TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG BHQ1
SVIP-MP Fw	GGC CCC CTC AAA GCC GA
SVIP-MP Rv	CGT CTA CGY TGC AGT CC
Opti1-F1	GTT ACG CGC CAG CAA AAG CAG G
Opti1-F2	GTT ACG CGC CAG CGA AAG CAG G
Opti1-R1	GTT ACG CGC CAG TAG AAA CAA GG

W=A/T, R=G/A, H=A/C/T, V= A/C/G, Y=C/T, N=A/C/T/G, D=A/G/T, S=G/C, B=C/G/T, K=G/T, M=A/C, BHQ1= Black Hole Quencher-1, FAM= Amidita de fluoresceína

8.9 RT-PCR convencional y en tiempo real

Ocupando el ARN extraído desde las muestras y mantenidas a -20°C, se realizó reacciones en cadena de polimerasa acoplada a una retrotranscripción de tipo convencional (RT-PCR) y en tiempo real (RT-qPCR). Para ambos métodos, se utilizó el producto qRT-PCR Brilliant III Probe Master Mix de Agilent, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para los ensayos de RT-qPCR se utilizó sonda TaqMan.

Partidores infA

Las condiciones específicas para la pareja de partidores de infA para la detección de VIA están detallados a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-qPCR usando los partidores infA y su programa de temperatura asociado.

Reactivo	Volumen (µL)	Programa de amplificación		
		Temperatura (C°)	Tiempo	Proceso
<i>Master Mix (2X)</i>	10			
Agua libre de nucleasas	6,3	50	10'	Transcripción Inversa
RT	1	95	3'	Activación PCR
infA Fw (10 µM)	0,4	95	15"	Amplificación (x40)
infA Rv (10 µM)	0,4	60	45"	
Sonda infA (15 µM)	0,4	4	∞	-
Dye (15 µM)	0,3			
DTT (1 mM)	0,2			
ARN muestral	1			
Volumen final	20			

Partidores SVIP-MP

Las condiciones específicas para la pareja de partidores de SVIP-MP para la detección de VIA están detallados a continuación en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores SVIP-MP y su programa de temperatura asociado.

Reactivo	Volumen (µL)	Programa de amplificación		
		Temperatura (C°)	Tiempo	Proceso
<i>Master Mix (2X)</i>	10			
Agua libre de nucleasas	7,2	50	10'	Transcripción Inversa
RT	1	95	3'	Activación PCR
SVIP-MP Fw (10 µM)	0,3	95	10"	Amplificación (x45)
SVIP-MP Rv (10 µM)	0,3	64	30"	
DTT (1 mM)	0,2	60	10"	
ARN muestral	1	60	10'	Extensión
Volumen final	20	4	∞	-

Partidores Opti1

Las condiciones específicas para el trío de partidores Opti1 utilizados para realizar reacciones de RT-PCR de multisegmento (M-RT-PCR) para la detección de VIA están detallados a continuación en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores Opti1 y su programa de temperatura asociado.

Reactivo	Volumen (µL)	Programa de amplificación		
		Temperatura (C°)	Tiempo	Proceso
<i>Master Mix (2X)</i>	10			
Agua libre de nucleasas	7	50	10'	Transcripción Inversa
RT	1	95	3'	Activación PCR
Opti1-F1 (10 µM)	0,14	94	30"	Amplificación (x5)
Opti1-F2 (10 µM)	0,26	44	30"	
Opti1-R1 (10 µM)	0,4	68	3'30"	
DTT (1 mM)	0,2	94	30"	Amplificación (x26)
ARN muestral	1	57	30"	
Volumen final	20	68	3'30"	
		68	10'	Extensión
		4	∞	-

Partidores Cor

Las condiciones específicas para la pareja de partidores Cor para la detección de pancoronavirus están detallados a continuación en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores Cor y su programa de temperatura asociado.

Reactivo	Volumen (µL)	Programa de amplificación		
		Temperatura (C°)	Tiempo	Proceso
<i>Master Mix (2X)</i>	10			
Agua libre de nucleasas	7	50	10'	Transcripción Inversa
RT	1	95	3'	Activación PCR
Cor Fw (10µM)	0,4	95	15"	Amplificación (x50)
Cor Rv (10µM)	0,4	48	30"	
DTT (1 mM)	0,2	60	15"	
ARN muestral	1	60	10'	Extensión
Volumen final	20	4	∞	-

Partidores IZS

Las condiciones específicas para la pareja de partidores de IZS para la detección de pancoronavirus están detallados a continuación en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Volúmenes de reactivos utilizados para las reacciones de RT-PCR usando los partidores IZS y su programa de temperatura asociado.

Reactivo	Volumen (μL)	Programa de amplificación		
		Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Proceso
<i>Master Mix (2X)</i>	10			
Agua libre de nucleasas	7	50	10'	Transcripción Inversa
RT	1	95	3'	Activación PCR
IZS Fw (10 μM)	0,4	95	15"	
IZS Rv (10 μM)	0,4	45	30"	Amplificación (x50)
DTT (1 mM)	0,2	60	15"	
ARN muestral	1	60	10'	Extensión
Volumen final	20	4	∞	-

8.10 Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de los productos de RT-PCR obtenidos, se realizó electroforesis en gel de agarosa utilizando el sistema de *buffer* Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. El porcentaje del gel de agarosa dependió del tamaño del amplicón generado durante reacción de RT-PCR. Para partidores SVIP-MP, Cor e IZS se utilizó un porcentaje de 2% y para los partidores Opti1 un porcentaje de 1,5%. La electroforesis se realizó utilizando un voltaje de 70 V durante 30 minutos. En cada carril del gel se cargó 5 μL de producto obtenido desde los RT-PCR con 1 μL de *buffer* de carga 6X (ThermoFisher). Como referencia, se utilizaron marcadores *DNA Ladder* de 1 kb y 100 bp (Life Technologies).

8.11 Inoculaciones en huevos embrionados

La cantidad de huevos embrionados utilizados en este trabajo se adaptaron a los resultados obtenidos de RT-PCR. Aquellos grupos que entregaron amplicones para VIA y CA fueron inoculados en nuevos traspasos (**Tabla 9**).

Tabla 9: Traspasos en huevos embrionados realizados en esta Memoria de Título.

Muestras inoculadas en huevo	Primer traspaso (t1)	Segundo traspaso (t2)	Tercer traspaso (t3)
Grupos 1-25	X	-	-
Grupo 5	-	X	X
Grupo 7	-	X	X
Muestras Grupo 5 (27, 41, 69, 94.1, 98)	X	X	-
Muestras Grupo 7 (45, 48, 56, 66 y 94.1)	X	X	-

Los grupos 1-25 se les realizó un primer traspaso (t1) de manera duplicada en dos huevos (H1, H2). Los grupos 5 y 7 se les realizó un segundo (t2) y tercer traspaso (t3) de manera quintuplicada (H1-H5). Las muestras individuales de los grupos 5 y 7 se les realizó un primer y segundo traspaso de manera duplicada (H1 y H2).

8.12 Preparación y enriquecimiento viral de muestras

Para aislar las partículas virales se realizó un procedimiento de enriquecimiento mediante ultra-centrifugación. Se construyeron 2 grupos: el primero con 6 muestras, pertenecientes a *Chionis albus*, y el segundo que incluye las demás muestras excluyendo las muestras pertenecientes a *Chionis albus* y *Leptonychotes weddellii* (109 muestras). Previamente se centrifugó a 7.000 x g por 10 minutos con el fin de eliminar los sedimentos de mayor tamaño. Luego se centrifugó a 30.000 x g por 3 horas y 15 minutos para sedimentar las partículas virales. Luego, se resuspendió el sedimento en 150 µL de glicina 0.2 N, dejando reposar después en hielo y agitando por *flicking* (movimiento rápido y repetido utilizando dedos para mezclar los componentes) cada 5 minutos. Posteriormente, se agregó 150 µL de PBS 2X a pH 7,2, y se clarificó la muestra a 12.000 x g por 15 minutos. El sobrenadante se rescató y se centrifugó a 30.000 x g por 3 horas y 15 minutos, para así rescatar nuevamente las partículas virales. Por último, el sedimento se resuspendió en 200 µL de PBS.

8.13 Preparación de bibliotecas y secuenciación

Tras el enriquecimiento del ARN total para las secuencias víricas mediante centrifugación, se utilizó el kit “Ribozero Plus” de Illumina para eliminar ARN ribosomal (ARNr), con un protocolo personalizado para Magelia (INOREVIA, París, Francia). Se utilizaron 2 µL de ARN total dentro del instrumento. El ARN total se analizó con el sistema Bioanalyzer 2100 luego de utilizar un chip de nano ARN para determinar la contaminación por ARNr. A continuación, para la preparación de las bibliotecas se realizó el protocolo Illumina para el ARN monocatenario presente utilizando 100 ng de ARN.

8.14 Análisis bioinformático

Se evaluó la calidad de las lecturas, mapeo y ensamblaje *de novo* con la herramienta Genomics Workbench (CLC, Qiagen, París, Francia). El ensamblaje de lecturas se realizó con los siguientes parámetros: longitud mínima del *contig* = 200, longitud máxima de *contig* = 7500; tamaño de palabra y andamiaje automáticos, y las distancias emparejadas fueron detectadas automáticamente. Por último, las lecturas se volvieron a mapear sobre los *contigs* para consolidar los resultados. Finalmente, los *contigs* ensamblados se sometieron a un BLAST utilizando la base de datos blast-nr perteneciente al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

8.15 Flujo de trabajo

Debido a la cantidad de m.a. y líquidos alantoideos, se estableció un orden en la realización de la metodología. Los 25 grupos fueron analizados directamente como sus cosechas de líquidos alantoideos utilizando RT-PCR (**Figura 6**).

Posteriormente, las muestras positivas se les analizaron sus muestras de manera individual, con el fin de identificar cual es aquella muestra positiva original. Estas muestras individuales fueron analizadas tanto directamente como sus cosechas de líquidos alantoideos utilizando RT-PCR. Aquellas muestras individuales que resultaron positivas, se consideraron con una posible presencia de VIA/CA.

Aquellos líquidos alantoideos que entregaron resultados positivos para VIA o CA fueron nuevamente inoculados en huevos embrionados para aumentar el título viral.

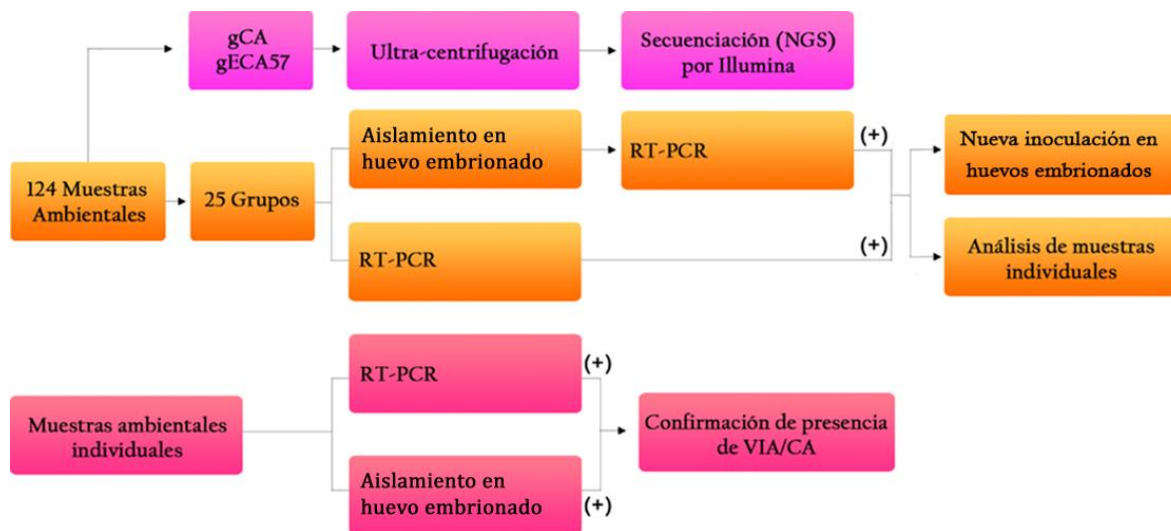


Figura 6: Diagrama de flujo de experimentos realizados en el presente trabajo, con el fin de establecer la presencia de VIA y CA en m.a. antárticas.

9. RESULTADOS

9.1 Obtención de muestras ambientales

La Expedición Antártica Chilena 57 fue realizada con el fin de obtener muestras provenientes de la fauna de la península antártica, específicamente en Punta Armonía, Isla Nelson, donde el principal objetivo fue la recolección masiva de muestras para obtener una mayor probabilidad de detección viral. Debido al surgimiento de un brote de COVID-19 dentro de la base General Bernardo O'Higgins, la expedición ECA57 fue interrumpida y terminada antes de lo previsto, con lo que se alcanzó a permanecer 4 días en territorio antártico, resultando finalmente en la obtención de 124 m.a. (**Figura 7**), las cuales fueron recolectadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL con 500 μ L de MTV y guardadas finalmente a -80°C .

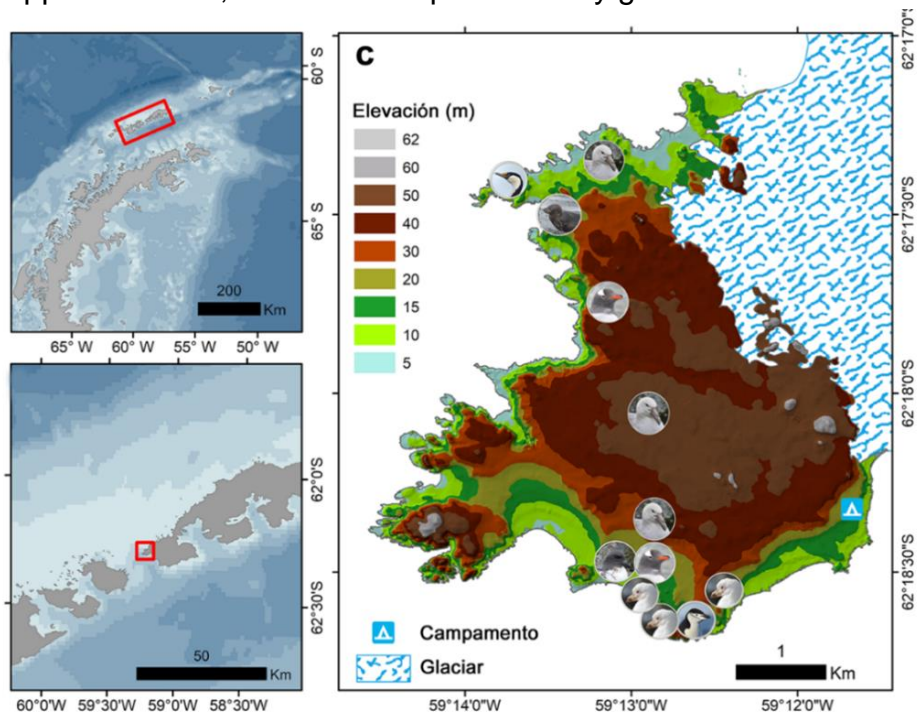


Figura 7: Mapa del litoral de Punta Armonía, Isla Nelson. Dentro de la leyenda se puede observar las cotas que indican la altura correspondiente de la Isla Nelson, junto con la ubicación en donde se obtuvieron las muestras ambientales de cada especie. Dentro de estas se encuentran petrel gigante (*Macronectes giganteus*), paloma antártica (*Chionis albus*), cormorán (*Leucocarbo bransfieldensis*), escúas polares (*Stercorarius maccormicki*), pingüino papúa (*Pygoscelis papua*), pingüino barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) y foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*).

9.2 Presencia de CA en muestras ambientales

Para realizar el *screening* para el CA, como control positivo se utilizaron muestras provenientes de pacientes que resultaron positivos para SARS-CoV-2 (indicados como C+, C1+ y C2+). Para la evaluación de la presencia de CA se utilizaron los partidores de uso estándar presentes en nuestro Laboratorio de Virus Emergentes: Cor Fw/Rv (Vijgen et al., 2008) y IZS Fw/Rv (Lelli et al., 2013), los cuales amplifican un fragmento conservado ubicado en la secuencia que codifica la proteína RdRp y que genera amplicones de 251 pb y 180 pb, respectivamente. Ambos partidores

Primeramente, se evaluó la presencia de CA sobre las extracciones de ARN de los grupos 1 al 25 utilizando RT-PCR y revelados posteriormente utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE (**Figura 8**). Se observaron amplicones asociados al tamaño esperado para los grupos g6, g7, g10, g13, g21, g22, g23 y g24.

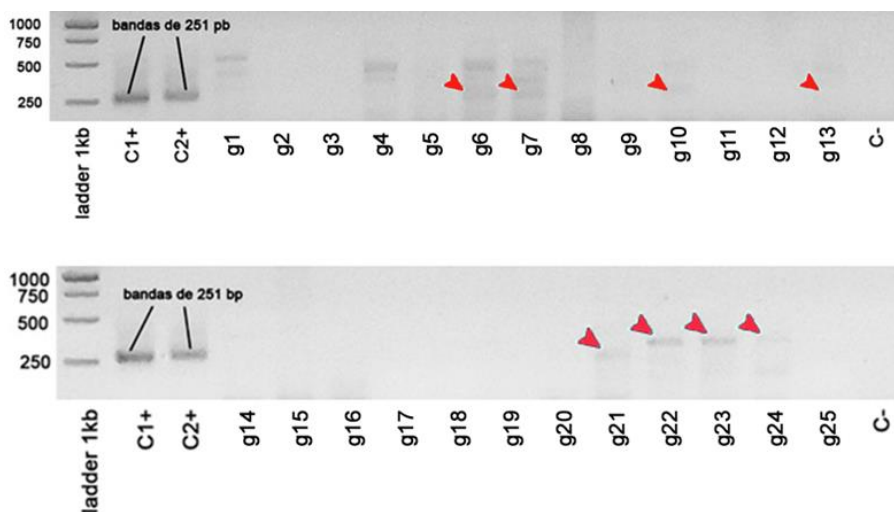


Figura 8: Detección de CA en grupos 1-25 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 1kb DNA Ladder (Life Technologies). C1+ y C2+: controles positivos de SARS-CoV-2. C-: control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C1+ y C2+: 251 pb. Flechas rojas indican amplicones para CA.

Los grupos que entregaron amplicones se procedieron a analizar de manera individual las muestras que los componen (**Figura 9**). El revelado en gel de agarosa muestran amplicones en las muestras 64.1 (grupo 10), 42 y 47.1 (grupo 13).

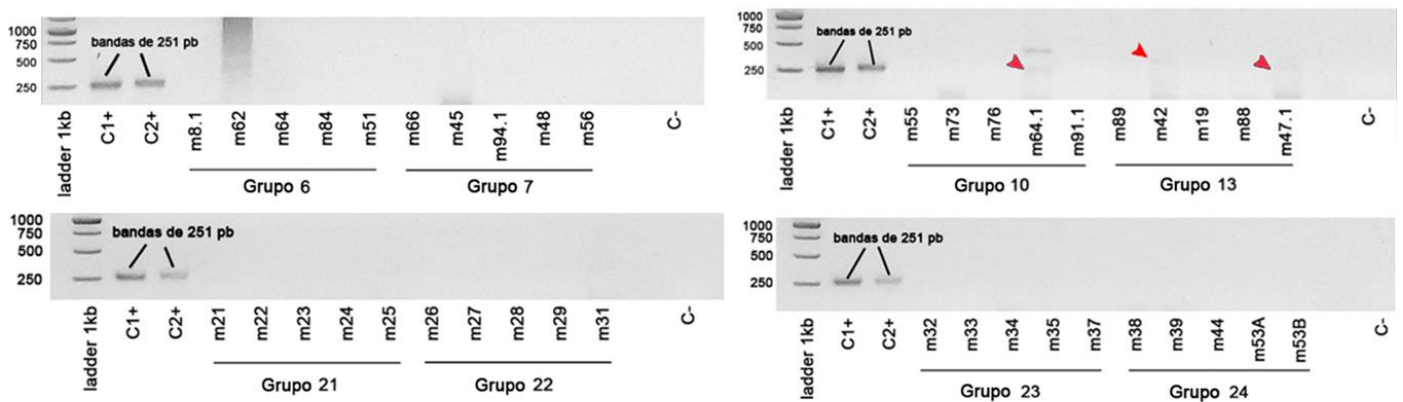


Figura 9: Detección de CA en muestras individuales de grupos 6, 7, 10, 13, 21, 22, 23 y 24 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 1kb DNA Ladder (Life Technologies). C1+ y C2+: controles positivos de SARS-CoV-2. C-: control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C1+ y C2+: 251 pb. Flechas rojas indican amplicones para CA.

Posteriormente, se inocularon estos 25 grupos en huevos embrionados, utilizando dos huevos por cada grupo (H1 y H2). Luego de cosechar los líquidos alantoideos de estos huevos, se continuó el *screening* realizando RT-PCR sobre las extracciones de ARN de estos últimos (**Figura 10 y Figura 11**). Dentro de todos los grupos, el grupo 5 entregó un amplicón a la altura esperada en el huevo 1 (g5 t1 H1), indicando la posible presencia de CA en aquel líquido alantoideo (**Figura 10**).

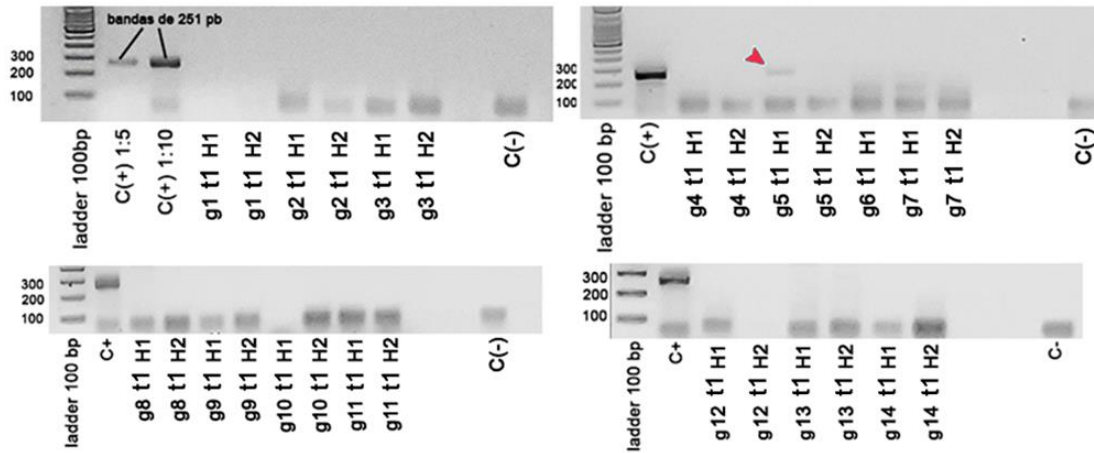


Figura 10: Detección de CA en primer traspaso (t1) de grupos 1-14 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder (Life Technologies). C+: control positivo de SARS-CoV-2. C-: control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C+: 251 pb. Flecha roja indica amplicón para CA.

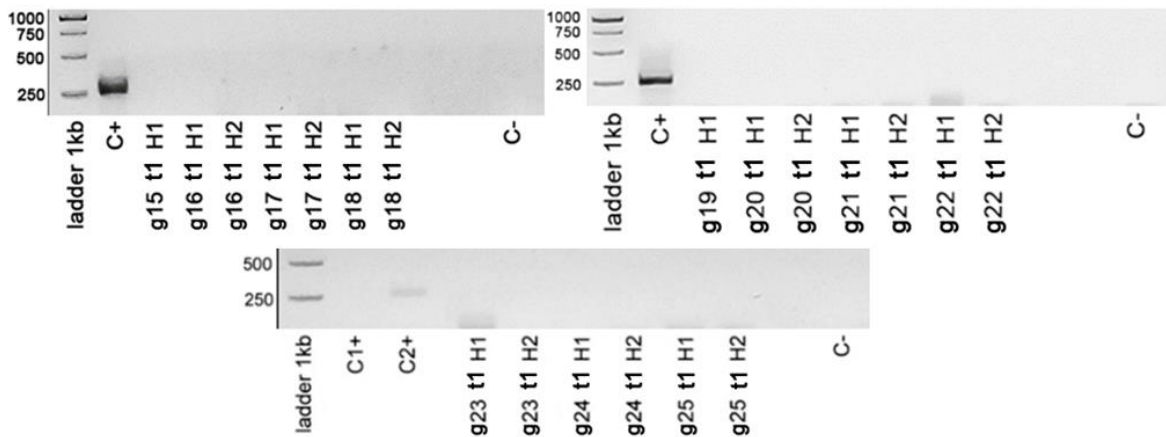


Figura 11: Detección de CA en primer traspaso (t1) de grupos 15-25 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 1kb DNA Ladder (Life Technologies). C+, C1+ y C2+: controles positivos de SARS-CoV-2. C-: control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C+, C1+ y C2+: 251 pb.

Teniendo en consideración el resultado obtenido, el *screening* para CA se enfocó sobre el grupo 5. Con el fin de aislar las posibles partículas virales presentes en el grupo 5, se realizó un segundo y tercer traspaso en huevos embrionados. Por consiguiente, aquellos nuevos traspasos fueron analizados con RT-PCR (Figura 12).

Dentro del presente año se agregó el uso de los partidores IZS Fw/Rv, los cuales, debido a su temperatura más baja de alineamiento, entrega una mayor probabilidad de hibridación entre los partidores y la secuencia blanco.

Dentro del segundo traspaso del grupo 5 se pueden observar amplicones a la altura esperada en los huevos 1 y 3 (H1 y H3) (**Figura 12A**), mientras que no se observan bandas en el tercer traspaso (**Figura 12B**).

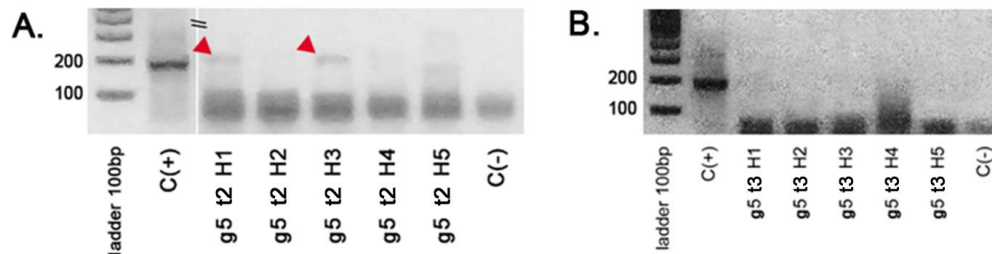


Figura 12: Detección de CA en grupo 5 mediante RT-PCR utilizando partidores IZS Fw/Rv. (A.) Segundo traspaso de grupo 5. (B.) Tercer traspaso de grupo 5. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder (Life Technologies). C+: control positivo de SARS-CoV-2. C-: control negativo. Tamaño teórico de amplicón C+: 180 pb. Flechas rojas en panel A. indica amplicón para CA.

Finalmente, con el fin de identificar cual muestra es aquella que contiene el posible CA, se realizó RT-PCR sobre las muestras individuales del grupo 5 (**Figura 13**) y en sus segundos y terceros traspasos en huevos embrionados (**Figura 14**), en donde no se observa bandas específicas a la altura esperada.

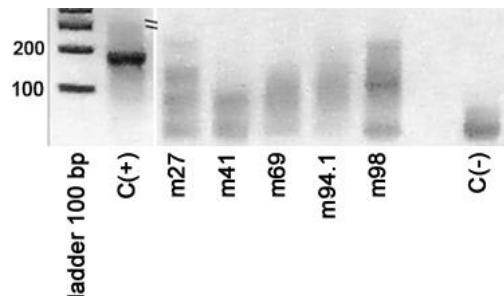


Figura 13: Detección de CA en muestras individuales de grupo 5 mediante RT-PCR utilizando partidores IZS Fw/Rv. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder (Life Technologies). C+: control positivo de SARS-CoV-2. C-: control negativo. Tamaño teórico de amplicón C+: 180 pb.

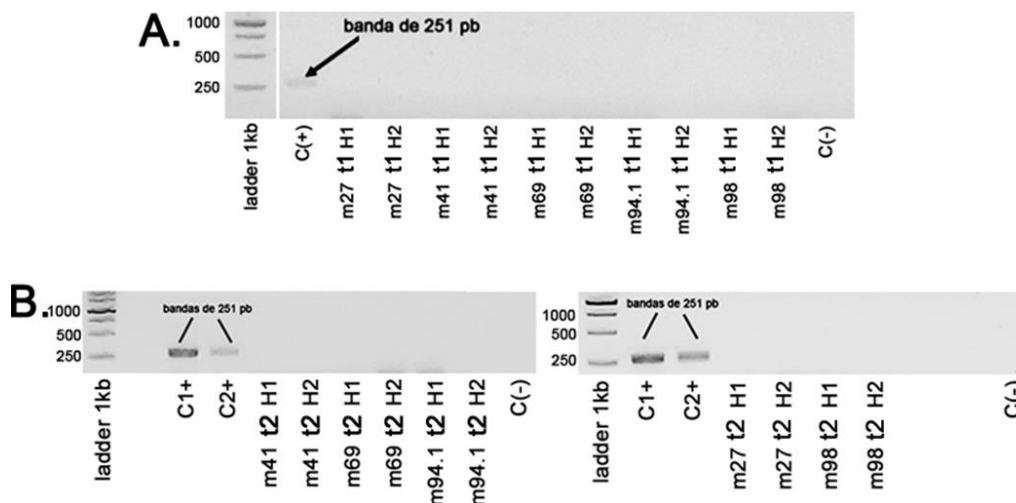


Figura 14: Detección de CA en muestras individuales de grupo 5 mediante RT-PCR utilizando partidores Cor Fw/Rv. (A.) Primer traspaso de muestras 27, 41, 69, 94.1 y 98. **(B.)** Segundo traspaso de muestras 27, 41, 69, 94.1 y 98. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 1kb DNA Ladder (Life Technologies). C+, C1+ y C2+: controles positivos de SARS-CoV-2. C-: control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C+, C1+ y C2+: 251 pb.

Dentro del alcance de esta Memoria, se logró detectar un posible CA dentro del grupo 5, específicamente en sus primeros y segundos traspasos en huevos embrionados.

9.3 Presencia de VIA en muestras ambientales

Para realizar el *screening* para VIA, se utilizó el mismo flujo de trabajo utilizado en el caso del *screening* de CA. Se realizó RT-PCR convencional utilizando dos (2) parejas de partidores disponibles: SVIP-MP y Opti1. La pareja de partidores SVIP-MP amplifica un fragmento conservado ubicado en la secuencia que codifica la proteína M y que genera amplicones de 189 pb (Nagy et al., 2021). Los partidores Opti1 (conocidos como multisegmento) detectan de manera universal VIA, debido a que son capaces de reconocer el extremo 5' y 3' de los 8 segmentos del genoma viral con el fin de amplificar todo el genoma viral. Estos tamaños corresponden a: M

y NS (~1000 pb); NP y NA (~1500 pb); HA (~1700 pb) y las proteínas del complejo viral de la polimerasa vRNP, PA, PB1 y PB2 (~2500 pb). Dentro del presente año 2022 se incorporó el uso de RT-PCR en tiempo (RT-qPCR), el cual utiliza la pareja de partidores infA junto con su sonda asociada. Esta pareja de partidores amplifica un fragmento conservado entre distintas especies animales, ubicado en la secuencia que codifica la proteína M y que genera amplicones de 121 pb. Como control positivo se utilizaron dos muestras positivas para VIA humana: F2141 (C1+) y F2149 (C1+ y C2+).

Utilizando los partidores Opti1, se observan amplicones en los grupos g7, g17 y g25 (Figura 15). Utilizando los partidores SVIP-MP se observa un amplicón en el grupo 7 (Figura 16), el cual coincide con el resultado observado anteriormente. Considerando las amplificaciones realizadas con ambas parejas de partidores, se procedió a inocular el grupo 7 en huevos embrionados de manera consecutiva.

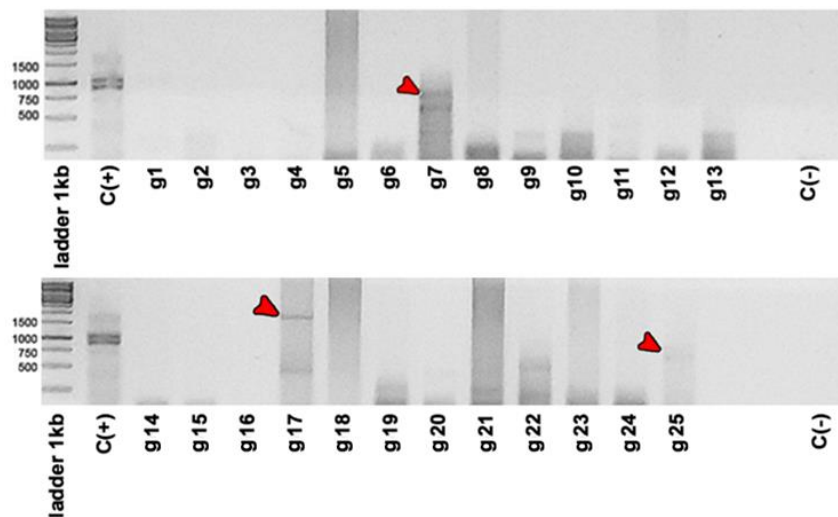


Figura 15: Detección de VIA en grupos (1-25) mediante RT-PCR utilizando partidores Opti1. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 1kb DNA Ladder (Life Technologies). C+: control positivo F2141. C-: control negativo. Tamaños teóricos de amplicones: M y NS (~1000 pb); NP y NA (~1500 pb); HA (~1700 pb); vRNP, PA, PB1 y PB2 (~2500 pb). Flechas rojas indican amplicones para VIA.

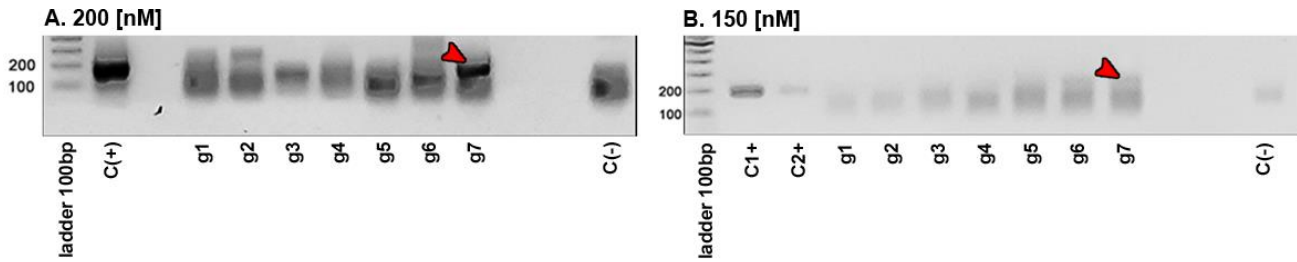


Figura 16. Detección de VIA en grupos 1-7 mediante RT-PCR utilizando partidores SVIP-MP. (A.) Concentración final de partidores de 200 [nM]. **(B.)** Concentración final de partidores de 150 [nM]. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder (Life Technologies). C+, C1+: control positivo F2141. C2+: control positivo F2149. C-: control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C+, C1+ y C2+: 189 pb. Flechas rojas en paneles A y B indican amplicones para VIA.

Para el primer traspaso del grupo 7 en huevo embrionado se puede observar que no existió amplicón asociado a la altura esperada (**Figura 17**).

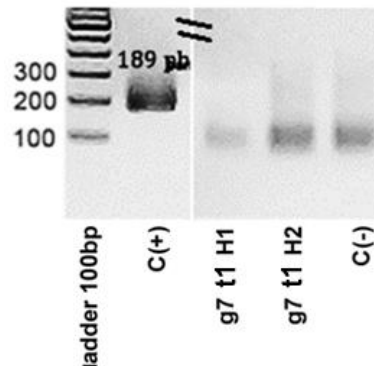


Figura 17. Detección de VIA en primer traspaso de grupo 7 mediante RT-PCR utilizando partidores SVIP-MP. Los productos de amplificación fueron resueltos utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE. El estándar de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder (Life Technologies). C+: control positivo F2149. C-: control negativo. Tamaño teórico de amplicón C+: 189 pb.

Dentro del presente año 2022 se implementó el uso de RT-qPCR dentro de esta Memoria. Considerando esto, se procedió a analizar los segundos y terceros traspasos del grupo 7 en huevo embrionado (**Figura 18**). Se observan resultados negativos para los segundos y terceros traspasos del grupo 7, lo que demuestra que las partículas de VIA presentes en aquel grupo no lograron crecer o adaptarse a huevos embrionados.

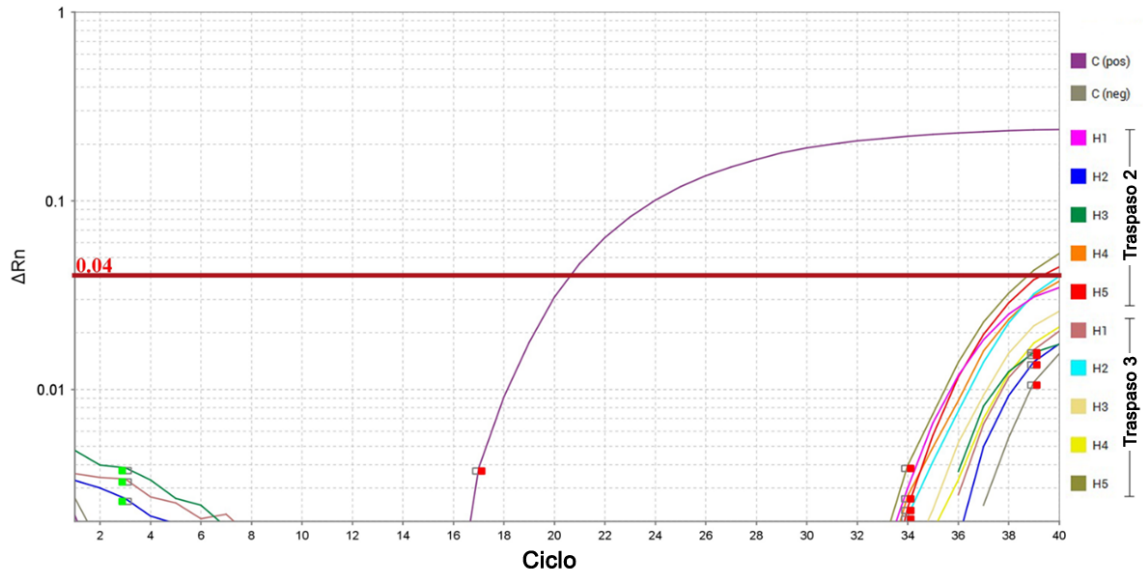


Figura 18: Detección de VIA en segundo (t2) y tercer traspaso (t3) de grupo 7 mediante RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv. C(pos): control positivo F2149. C(neg): control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C+: 121 pb.

Finalmente, con el fin de identificar cual muestra es aquella que contiene el posible VIA, se realizó RT-qPCR sobre las muestras individuales del grupo 7 (**Figura 19**) y en sus segundos y terceros traspasos en huevos embrionados (**Figura 20**). Analizando las muestras individuales del grupo 7 (m45, m48, m56, m66 y m94.1), se observa una señal fluorescente en m45 al comienzo del ciclo 28. Sin embargo, el primer (t1) y segundo traspaso (t2) de las mismas muestras individuales resultaron negativas para VIA.

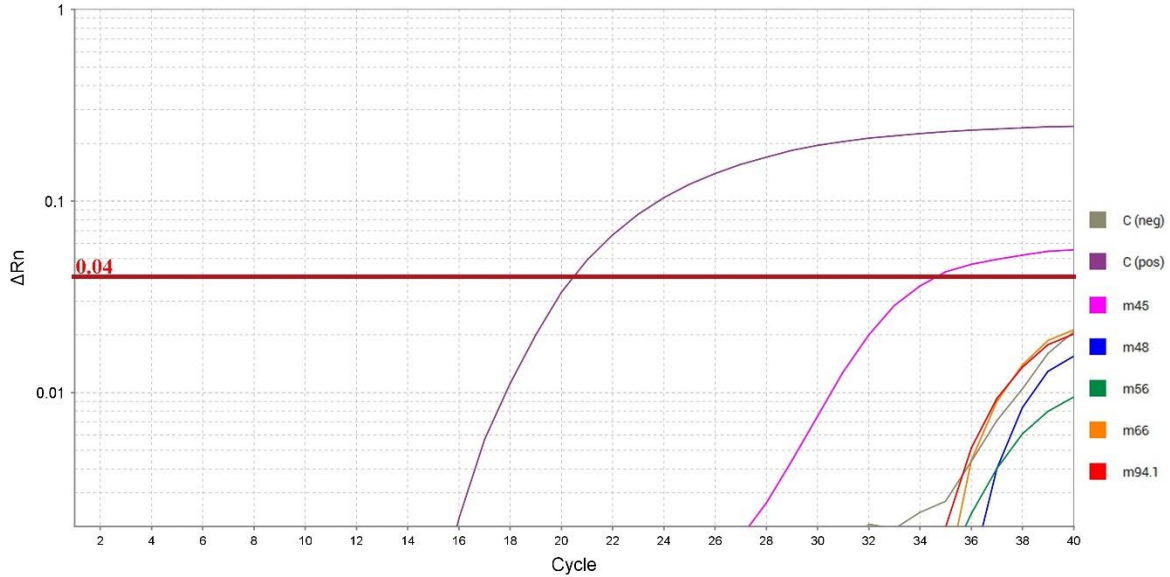


Figura 19: Detección de VIA en muestras individuales del grupo 7 mediante RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv. C(pos): control positivo F2149. C(neg): control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C+: 121 pb. Ct(m45): 34,6.

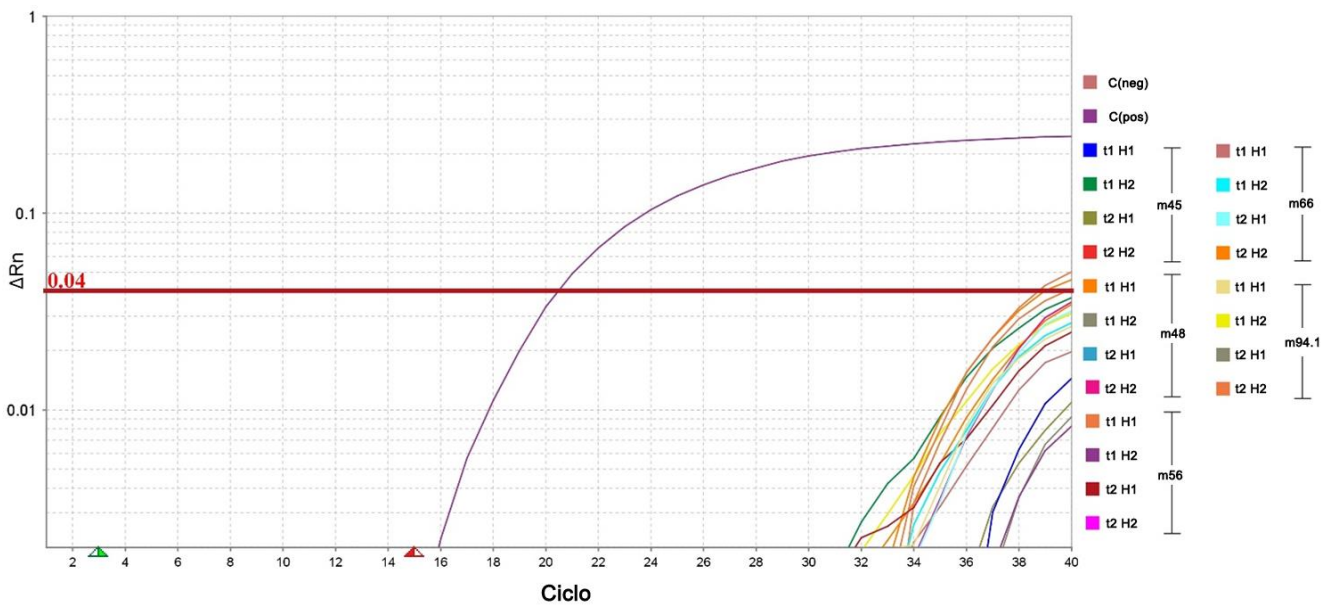


Figura 20. Detección de VIA en primer (t1) y segundo traspaso (t2) de muestras individuales del grupo 7 mediante RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv. C(pos): control positivo F2149. C(neg): control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C(pos): 121 pb.

Se analizó finalmente los grupos 17 y 25 utilizando la pareja de partidores infA mediante RT-qPCR. Se observa una señal fluorescente en el grupo 17 al comienzo del ciclo 28 (**Figura 21**).

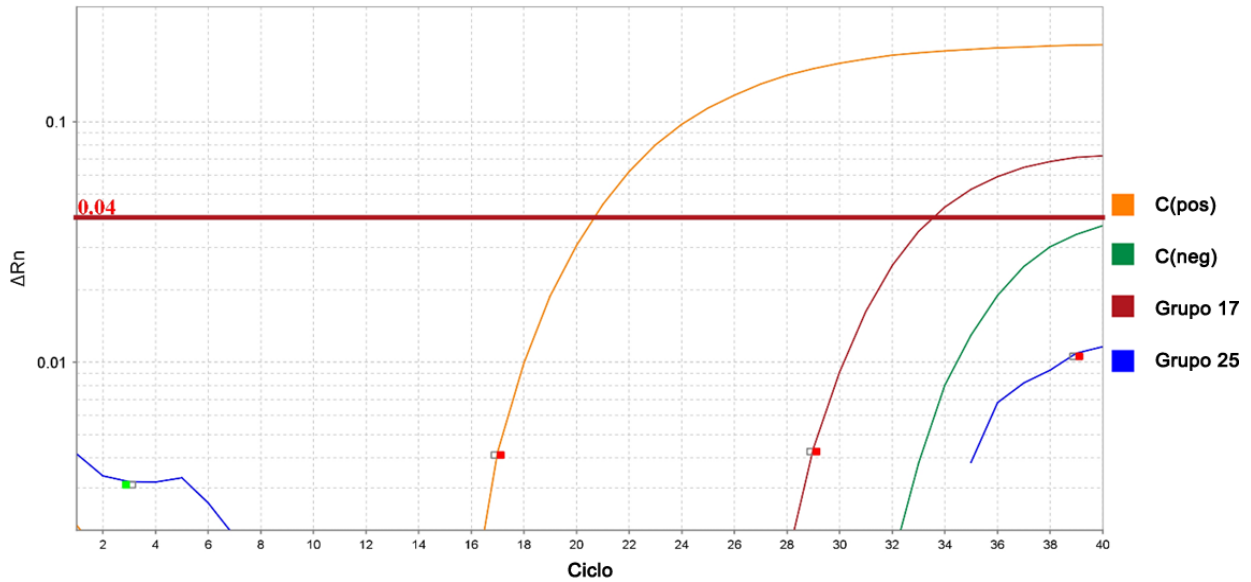


Figura 21: Detección de VIA en grupos 17 y 25 mediante RT-qPCR utilizando partidores infA Fw/Rv. C(pos): control positivo F2149. C(neg): control negativo. Tamaños teóricos de amplicones C+: 121 pb. Ct(grupo 17): 33,5.

Dentro del alcance de esta Memoria, se logró detectar un posible VIA dentro del grupo 7 (específicamente en la muestra 45) y grupo 17. Los resultados positivos en las muestras directas y no en sus trasposos indican que este virus no logró adaptarse a huevos embrionados.

9.4 Detección metagenómica viral en muestras de *Chionis albus*

La secuenciación de nueva generación (NGS) realizada sobre las seis muestras pertenecientes a *Chionis albus* generó un total de 18.259.501 lecturas totales, los cuales 1.817.608 (9.9%) pertenecen a lecturas de origen viral. A partir de esto, se generaron 386 *contigs* (lecturas de secuencias superpuestas que se unen para producir una secuencia única), de los cuales 118 fueron asociados a especies virales ya descritas previamente en la naturaleza. Estos virus se encuentran clasificados en 17 familias virales (Picornaviridae, Peribunyaviridae, Parvoviridae, Nimaviridae, Nairoviridae, Marnaviridae, Iflaviridae, Hypoviridae, Hominidae,

Herpesviridae, Myoviridae, Hantaviridae, Geminiviridae, Flaviviridae, Caliciviridae, Baculoviridae, Ackermannviridae) y 4 grupos no clasificados (**Figura 22**).

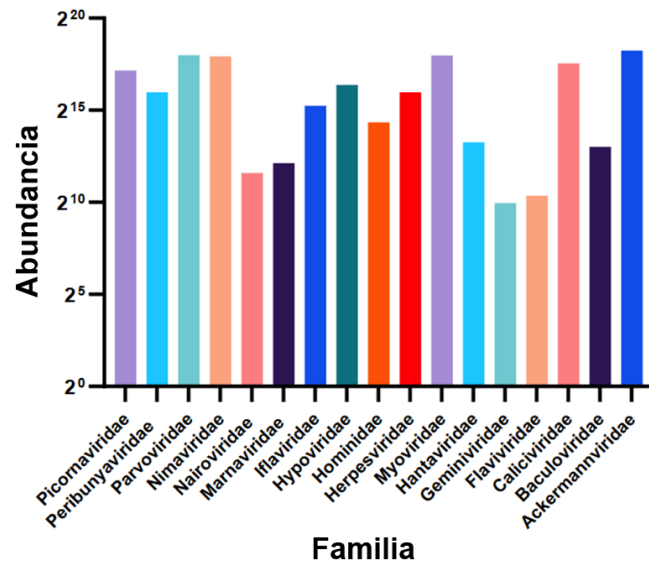


Figura 22: Abundancia absoluta de las familias virales presentes en muestras obtenidas de *Chionis albus*. Cada abundancia se encuentra medida en cantidad de lecturas asociadas a cada familia.

Los 4 grupos no identificados son aquellos que, a pesar de tener similitudes en sus *contigs*, al compararlas dentro de la base de datos pertenecientes al NCBI, no lograron ser clasificadas dentro de un taxón.

10. DISCUSIÓN

10.1 Presencia de coronavirus aviar en muestras ambientales

En esta Memoria se utilizó principalmente la herramienta molecular RT-PCR para realizar un *screening* para VIA y CA (γ -CoV y δ -CoV) en 124 m.a. obtenidas desde la fauna perteneciente a la península antártica. La utilización de distintos métodos de detección enriquece los resultados sugiriendo la presencia de CA en aves silvestres antárticas. Actualmente solo existe un reporte por NGS que identifica un *contig* de CA antártico (Wille et al., 2020) y de manera general, existen a la fecha 32 estudios de *screening* (utilizando RT-PCR y RT-qPCR), donde se han ocupado 9 métodos distintos (Wille & Holmes, 2020), provocando que existan rendimientos diferentes en cada estudio, limitando las comparaciones entre ellos y obteniendo sensibilidades y rendimientos estadísticamente diferentes (Chamings et al., 2018).

Dentro de esta Memoria se utilizó la pareja de partidores Cor Fw/Rv e IZS Fw/Rv, debido a que ambos se encuentran previamente validados en estudios para la búsqueda de coronavirus (Lelli et al., 2013; Vijgen et al., 2008). Estos partidores son de tipo 'pancoronavirus', es decir, poseen una secuencia de consenso degenerada, lo que nos permite la detección de todo el espectro de coronavirus (α -CoV, β -CoV, γ -CoV y δ -CoV). Utilizando estas dos parejas de partidores se logró determinar la presencia de CA en el grupo 5. Estas posibles partículas no fueron detectadas al utilizar RT-PCR sobre la muestra directa, pero si fueron detectadas en sus primeros y segundos traspasos (**Figura 10 y 12**). Podemos concluir que dentro de este grupo existen partículas de coronavirus infecciosas, pero su bajo título viral no fue suficiente para sobrepasar el límite de detección perteneciente al ensayo de

RT-PCR. Al inocular de manera consecutiva en huevos embrionados, estas partículas virales lograron replicarse en los tejidos del huevo, permitiendo obtener una mayor cantidad de partículas de CA.

Al realizar los ensayos de RT-PCR sobre los 25 grupos (**Figura 8**), se observaron amplicones para los grupos 6, 7, 10, 13, 21, 22, 23 y 24 sin embargo, estos amplicones no se obtuvieron al realizar un análisis a sus muestras individuales (**Figura 9**). Se cree que unas de las posibles causas a esta situación sean las múltiples congelaciones y descongelaciones a las que fueron expuestas las muestras. Los virus con envoltura (como los VIA y los coronavirus) poseen una menor estabilidad y, por lo tanto, mayor fragilidad en comparación con aquellos virus sin envoltura, haciéndolos más inestables a cambios bruscos de temperaturas. Esto, sumado a la naturaleza inestable de sus genomas de ARN, genera que la integridad de los virus dentro de estas muestras podría verse afectada al momento de realizar los ensayos de RT-PCR de manera reiterada.

10.2 Presencia de Influenza A en muestras ambientales

Utilizando las tres parejas de partidores (SVIP-MP, Opti1 e infA), se logró determinar la presencia de VIA en la muestra 45 (perteneciente al grupo 7) y en el grupo 17. Estos marcadores genómicos fueron detectados analizando las muestras directas (**Figura 15 y 16**), sin embargo, al inocular estas muestras en huevos embrionados de manera consecutiva, no se obtuvieron resultados positivos para VIA. A partir de esto podemos concluir que el VIA que se encuentra en la muestra 45 no se replicó en los tejidos del huevo. Consideramos que una razón para este hecho es que las partículas de VIA presentes no se encuentren en forma de partícula viral infectiva,

sino que en forma de ácidos nucleicos libres. Esta idea ratifica los resultados negativos obtenidos en las inoculaciones del grupo 7 en huevos embrionados, ya que, al no existir partículas virales infectivas, no sería posible su aislamiento en huevos.

Esto podría explicar los resultados obtenidos en los ensayos de RT-qPCR para la muestra 45 (**Figura 19**) y para el grupo 17 (**Figura 21**), donde ambos poseen un Ct o umbral de ciclos (el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce el umbral) de 34,6 y 33,5 respectivamente. Aunque tengan valores razonables para considerarlas como positivas, estos indican una baja cantidad de marcadores genómicos asociados a VIA (Bustin et al., 2009). Esto último da pie a considerar la posibilidad de una cantidad baja de partículas infectivas de VIA dentro de la muestra, lo que afectaría directamente la probabilidad de adaptación a huevo embrionado.

La limitada cantidad de estudios donde se ha logrado detectar Influenza A podría indicar que la presencia de este virus dentro de la fauna antártica no es un hecho frecuente. Se cree que los virus que se han encontrado previamente son ingresados por aves migratorias, y que no se encuentran totalmente adaptados a las aves que se encuentran en el continente antártico (Smeele et al., 2018), lo que podría dar una explicación a la baja frecuencia en la detección de este virus dentro de esta Memoria.

10.3 Detección metagenómica de virus mediante NGS

Dentro de los estudios de virología, el aislamiento de una especie viral utilizando huevos embrionados es un proceso que suele tener complicaciones técnicas,

debido a la intervención de diversas variables. En base a la bibliografía, casos similares han ocurrido previamente, donde autores han tenido complicaciones al momento de aislar VIA, como en el caso de un subtipo H11 detectado en paloma antártica (Hurt et al., 2016) y un subtipo H4N7 detectado en petrel gigante (de Souza Petersen et al., 2017). En ambos estudios, los subtipos detectados no lograron adaptarse efectivamente a los tejidos del huevo embrionado, lo que podría estar asociado a características nuevas adquiridas por los virus que le impidan adaptarse a las aves de corral. El uso de NGS en ambos estudios les permitieron a los autores obtener las secuencias de ácidos nucleicos presentes en sus muestras positivas, lo que le permitió, en caso de Hurt et al., identificar segmentos como HA, MP y NS y a de Souza Petersen et al. los segmentos HA y NA.

Unos de los problemas presentes dentro de los estudios de vigilancia viral es el estado y preservación de las muestras ambientales colectadas. Factores abióticos como el pH, luz, y temperatura podrían afectar las partículas virales dentro de las muestras. Como resultado, la cantidad de ARN viral presente podría variar considerablemente, lo que podría afectar al momento de utilizar herramientas moleculares como RT-PCR o RT-qPCR (Fleige & Pfaffl, 2006).

Enfoques metagenómicos nos permiten obtener secuencias de genes o incluso los genomas completos de organismos no cultivables presentes dentro de una muestra compleja. Teniendo esto en cuenta, consideramos necesario el uso de herramientas de secuenciación de Sanger o Illumina con el fin de subtipicar y caracterizar los virus encontrados en las muestras positivas para VIA (muestra 45, grupo 17) y CA (grupo 5) y así obtener información acerca de las secuencias genómicas presentes.

De manera paralela se realizó la preparación de las muestras y enriquecimiento de las muestras de *Chionis albus*, las cuales fueron derivadas a secuenciación utilizando tecnologías Illumina. Los resultados obtenidos derivaron en la próxima publicación denominada “Scavengers as a sentinel for viral diversity: the Snowy sheathbill virome as a tool for monitoring virus introduction/circulation in Antarctica”. Este estudio se centra en el análisis de las seis muestras de paloma antártica, las cuales entregaron un total de 118 *contigs* asociados a especies virales ya descritas previamente en la naturaleza. Este estudio menciona la presencia de especies virales asociadas a moluscos, crustáceos, plantas, bacterias, hongos, cerdos, pinnípedos y humanos (**Figura 23**). Además, se destaca la presencia de secuencias asociadas a virus humanos como sapovirus (Caliciviridae) y gammaherpes (Herpesviridae).

Estos virus se encuentran clasificados en 17 familias virales y 4 grupos no clasificados, los cuales hacen destacar la diversidad y heterogeneidad viral que posee el viroma de *Chionis albus*. Se sugiere que esto es resultado de posibles transmisiones inter-especie debido a su dieta, la cual es particular considerando que es una especie depredadora y carroñera (Lin et al., 2018): se alimenta de krill, peces, calamares, carroña, algas, placenta, sangre, heces de focas y también toma huevos y polluelos de otras especies de aves. A medida que esta especie se alimenta, los virus presentes en estos hospederos se van almacenando dentro del intestino de la paloma antártica. Esto explicaría la gran diversidad de familias virales asociadas a hospederos provenientes de taxones tan distantes. Sus capacidades

migratorias le permiten además la posibilidad de ser vector para virus entre diferentes lugares de la Antártica y el continente.

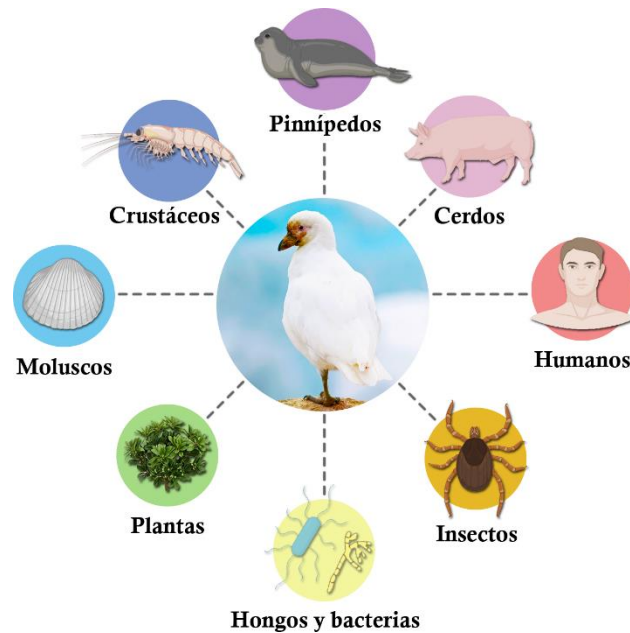


Figura 23: Representación de la diversidad del viroma encontrado en muestras de *Chionis albus* obtenidas en ECA57.

10.4 Variables bióticas y abióticas presentes en la recolección de muestras

Se sugiere tomar en consideración las fechas de recolección de muestras realizadas en la ECA57. Esta expedición fue realizada en diciembre del año 2020, época en la que no existe la máxima densidad poblacional de aves en la península antártica. Esta densidad alcanza su apogeo en los meses de enero y febrero, ya que durante esas fechas tanto pingüinos como aves voladoras comienzan la anidación y crianza de sus polluelos. Es de esperarse que una alta densidad de aves esté correlacionada con una mayor circulación de virus (Barbosa & Palacios, 2009; Gittins et al., 2020). Por esto se cree que la obtención de muestras fuera de estos dos meses afecta directamente en la probabilidad de detección de virus. Aun así, esto se menciona de manera especulativa, ya que a la fecha no existen estudios

asociados. El brote de COVID-19 sucedido dentro de la base General Bernardo O'Higgins y la interrupción de la ECA57 se debe considerar también como unas de las razones que haya afectado la toma de muestras, debido a la obtención de una menor cantidad de muestras esperadas (n=124).

Considerando el resultado obtenido asociado al δ -CoV encontrado en pingüino papúa, la comparación dentro de la base de datos del NCBI el cual fue centrado en la secuencia ORF1ab de RdRp (Wille & Holmes, 2020) determinó que existe similitud en sus secuencias genómicas con varios δ -CoV detectados en palomas y halcones ubicadas en los Emiratos Árabes y también en gaviotas ubicadas en Finlandia y Polonia (Wille & Holmes, 2020). Esta información sugiere que el rango de hospederos en aves silvestres podría ser mucho mayor que la descrita actualmente. Especies como las gaviotas comunes (*Larus spp.*) podrían jugar un rol importante en la introducción de virus emergentes, considerando sus movimientos migratorios dentro del hemisferio sur y el hecho que es un reservorio importante de δ -CoV (Wille et al., 2020).

A manera de dar continuación a los estudios de ecología viral en territorio antártico, dentro de los meses de enero y febrero del presente año se realizó la Expedición Antártica Chilena ECA58, el cual fue liderado por el Dr. Gonzalo Barriga Pinto. Esta expedición se enfocó en la recolección de nuevas m.a. y, además, la extracción de sueros aviares, permitiendo futuros estudios de serología, como ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o ensayos de inhibición de la hemaglutinación enfocados a virus específicos.

10.5 Limitaciones experimentales

Cabe destacar que el periodo experimental de esta Memoria fue realizado mayoritariamente durante el primer semestre del año 2021. La pandemia del COVID-19 y la consecuente restricción de movilidad fueron limitantes al momento de acceder a nuestro laboratorio. El Programa de Virología, ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, fue convertido de manera provisoria (en aquel periodo) en centro de diagnóstico para SARS-CoV-2, lo que redujo considerablemente nuestro espacio para trabajar, junto con el acceso a materiales e instrumentos de laboratorio.

Se debe considerar el uso de huevos embrionados para el aislamiento del VIA presente en el grupo 17. La limitación en la disponibilidad de huevos embrionados y el tiempo requerido para el análisis completo será considerado para trabajo futuro.

Como propuesta para trabajos futuros consideramos el uso de líneas celulares para aislamiento celular, recomendadas en literatura, como células caninas Madin-Darby (MDCK), células primarias de embrión de pollo (CEK) o fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF) (Moresco et al., 2010), las cuales se caracterizan por sus altos niveles de expresión de ambos tipos de AS (α -2,3 y α -2,6).

A pesar de estas limitaciones, se logró identificar VIA y CA, los cuales podrían ser utilizados como punto de partida para nuevas investigaciones y futuramente secuenciados desde los huevos embrionados para caracterizar en detalle estas muestras. La determinación del viroma presente en *Chionis albus* nos revela la complejidad y alta diversidad viral presente en la muestra. Este estudio nos confirma

que Antártica sigue siendo un territorio enigmático, y pone en evidencia la importancia de esta Memoria para complementar los vacíos de información que existen dentro de esta área de las ciencias. Se requieren futuros y continuos estudios de vigilancia para comprender de mejor manera la ecología viral presente en este continente.

11. CONCLUSIONES

- I. Se logró detectar VIA dentro de las muestras provenientes de la fauna antártica, siendo el séptimo reporte de este virus en la península antártica.
- II. De igual manera, se logró detectar CA en las muestras provenientes de la fauna antártica, siendo el segundo reporte de este tipo de virus en la península antártica.
- III. Análisis metagenómico del viroma de *Chionis albus* sugiere una alta diversidad de virus, incluso provenientes de mamíferos, pudiendo estar asociado a sus comportamientos carroñeros.

12. REFERENCIAS

- Alymova, I. v., York, I. A., Air, G. M., Cipollo, J. F., Gulati, S., Baranovich, T., Kumar, A., Zeng, H., Gansebom, S., & McCullers, J. A. (2016). Glycosylation changes in the globular head of H3N2 influenza hemagglutinin modulate receptor binding without affecting virus virulence. *Scientific Reports*, 6(1), 36216. <https://doi.org/10.1038/srep36216>
- Ambepitiya Wickramasinghe, I. N., de Vries, R. P., Weerts, E. A. W. S., van Beurden, S. J., Peng, W., McBride, R., Ducatez, M., Guy, J., Brown, P., Etterradossi, N., Gröne, A., Paulson, J. C., & Verheije, M. H. (2015). Novel Receptor Specificity of Avian Gammacoronaviruses That Cause Enteritis. *Journal of Virology*, 89(17), 8783–8792. <https://doi.org/10.1128/JVI.00745-15>
- Antunez, M. P. (2020). La Ecología viral y su importancia en las enfermedades virales emergentes y re-emergentes. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 8.
- Barbosa, A., & Palacios, M. J. (2009). Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. *Polar Biology*, 32(8), 1095. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0640-3>
- Bauer, S., & Hoyer, B. (2014). Migratory Animals Couple Biodiversity and Ecosystem Functioning Worldwide. *Science (New York, N.Y.)*, 344, 1242552. <https://doi.org/10.1126/science.1242552>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, 34(6), 439–448. <https://doi.org/10.1080/03079450500367682>
- Chamings, A., Nelson, T. M., Vibin, J., Wille, M., Klaassen, M., & Alexandersen, S. (2018). Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Scientific Reports*, 8(1), 5980. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24407-x>
- de Macedo Couto, R., & Brandespim, D. F. (2020). A review of the One Health concept and its application as a tool for policy-makers. *International Journal of One Health*, 6(1), 83–89. <https://doi.org/10.14202/IJOH.2020.83-89>
- de Souza Petersen, E., de Araujo, J., Krüger, L., Seixas, M. M., Ometto, T., Thomazelli, L. M., Walker, D., Durigon, E. L., & Petry, M. V. (2017). First detection of avian influenza virus (H4N7) in Giant Petrel monitored by geolocators in the Antarctic region. *Marine Biology*, 164(4), 62. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3086-0>
- Dharmayanti, N. P. I., & Nurjanah, D. (2020). A Review on Coronaviruses: The Infectious Agent to Animals and Human. *WARTAZOA. Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 30(1), 1–14.

- Domańska-Blicharz, K., Miłek-Krupa, J., & Piłkuła, A. (2021). Diversity of Coronaviruses in Wild Representatives of the Aves Class in Poland. *Viruses*, 13(8), 1497. <https://doi.org/10.3390/v13081497>
- Endo, A., & Nishiura, H. (2018). The Role of Migration in Maintaining the Transmission of Avian Influenza in Waterfowl: A Multisite Multispecies Transmission Model along East Asian-Australian Flyway. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/3420535>
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- García-Sastre, A., & Richt, J. A. (2019). Editorial overview: Emerging viruses: interspecies transmission: Expect the unexpected. In *Current opinion in virology* (Vol. 34, pp. iii–vi). <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.02.003>
- Gittins, O., Grau-Roma, L., Valle, R., Abad, F. X., Nofrarías, M., Ryan, P. G., González-Solís, J., & Majó, N. (2020). Serological and molecular surveys of influenza A viruses in Antarctic and sub-Antarctic wild birds. *Antarctic Science*, 32(1), 15–20. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0954102019000464>
- Graham, J. P., Leibler, J. H., Price, L. B., Otte, J. M., Pfeiffer, D. U., Tiensin, T., & Silbergeld, E. K. (2008). The animal-human interface and infectious disease in industrial food animal production: rethinking biosecurity and biocontainment. *Public Health Reports (Washington, D.C.: 1974)*, 123(3), 282–299. <https://doi.org/10.1177/003335490812300309>
- Hanson, B. A., Luttrell, M. P., Goekjian, V. H., Niles, L., Swayne, D. E., Senne, D. A., & Stallknecht, D. E. (2008). Is the occurrence of avian influenza virus in Charadriiformes species and location dependent? *Journal of Wildlife Diseases*, 44(2), 351–361. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.2.351>
- Hurt, A. C., Su, Y. C. F., Aban, M., Peck, H., Lau, H., Baas, C., Deng, Y.-M., Spirason, N., Ellström, P., Hernandez, J., Olsen, B., Barr, I. G., Vijaykrishna, D., & Gonzalez-Acuna, D. (2016). Evidence for the Introduction, Reassortment, and Persistence of Diverse Influenza A Viruses in Antarctica. *Journal of Virology*, 90(21), 9674–9682. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-16>
- Khataby, K., Kasmi, Y., Souiri, A., Loutfi, C., & Ennaji, M. M. (2020). Avian Coronavirus: Case of Infectious Bronchitis Virus Pathogenesis, Diagnostic Approaches, and Phylogenetic Relationship Among Emerging Strains in Middle East and North Africa Regions. In *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* (pp. 729–744). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819400-3.00033-8>
- Lelli, D., Papetti, A., Sabelli, C., Rosti, E., Moreno, A., & Boniotti, M. (2013). Detection of Coronaviruses in Bats of Various Species in Italy. *Viruses*, 5(11), 2679–2689. <https://doi.org/10.3390/v5112679>
- Lin, D., Tsai, Y.-L., Ting, T.-C., Chan, F.-T., Lin, K.-H., & Tsai, C.-F. (2018). *The first wildlife rescue case of a Snowy Sheathbil (Chionis albus) from the Antarctica.*
- Ma, W., García-Sastre, A., & Schwemmler, M. (2015). Expected and Unexpected Features of the Newly Discovered Bat Influenza A-like Viruses. *PLOS Pathogens*, 11(6), e1004819. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004819>

- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., & Webster, R. (1999). The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology*, *73*(2), 1146–1155. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.2.1146-1155.1999>
- Milek, J., & Blicharz-Domańska, K. (2018). Coronaviruses in Avian Species - Review with Focus on Epidemiology and Diagnosis in Wild Birds. *Journal of Veterinary Research*, *62*(3), 249–255. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0035>
- Moresco, K. A., Stallknecht, D. E., & Swayne, D. E. (2010). Evaluation and attempted optimization of avian embryos and cell culture methods for efficient isolation and propagation of low pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Diseases*, *54*(1 Suppl), 622–626. <https://doi.org/10.1637/8837-040309-Reg.1>
- Mourya, D., Yadav, P., Ullas, P., Bhardwaj, S., Sahay, R., Chadha, M., Shete, A., Jadhav, S., Gupta, N., Gangakhedkar, R., Khasnobis, P., & Singh, S. (2019). Emerging/re-emerging viral diseases & new viruses on the Indian horizon. *Indian Journal of Medical Research*, *149*(4), 447. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1239_18
- Nabi, G., Wang, Y., Lü, L., Jiang, C., Ahmad, S., Wu, Y., & Li, D. (2021). Bats and birds as viral reservoirs: A physiological and ecological perspective. *Science of The Total Environment*, *754*, 142372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142372>
- Nagy, A., Černíková, L., Kunteová, K., Dirbáková, Z., Thomas, S. S., Slomka, M. J., Dán, Á., Varga, T., Máté, M., Jiřincová, H., & Brown, I. H. (2021). A universal RT-qPCR assay for “One Health” detection of influenza A viruses. *PLOS ONE*, *16*(1), e0244669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244669>
- Neira, V., Tapia, R., Verdugo, C., Barriga, G., Mor, S., Ng, T. F. F., García, V., del Río, J., Rodrigues, P., Briceño, C., Medina, R. A., & González-Acuña, D. (2017). Novel Avulaviruses in Penguins, Antarctica. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(7), 1212–1214. <https://doi.org/10.3201/eid2307.170054>
- Nuñez, I. A., & Ross, T. M. (2019). A review of H5Nx avian influenza viruses. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, *7*, 251513551882162. <https://doi.org/10.1177/2515135518821625>
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5772), 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Parrish, C. R., Holmes, E. C., Morens, D. M., Park, E.-C., Burke, D. S., Calisher, C. H., Laughlin, C. A., Saif, L. J., & Daszak, P. (2008). Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *72*(3), 457–470. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-08>
- Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., & Shukla, S. K. (2003). Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine & Research*, *1*(1), 5–12. <https://doi.org/10.3121/cm.1.1.5>

- Riedel, S. (2006). Crossing the species barrier: the threat of an avian influenza pandemic. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 19(1), 16–20. <https://doi.org/10.1080/08998280.2006.11928118>
- Seixas. (2016). *Estudo do vírus Influenza em aves marinhas na região subantártica*. Universidad de São Paulo.
- Smeele, Z. E., Ainley, D. G., & Varsani, A. (2018). Viruses associated with Antarctic wildlife: From serology based detection to identification of genomes using high throughput sequencing. *Virus Research*, 243, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.017>
- Thomas, J. K., & Noppenberger, J. (2007). Avian influenza: a review. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 64(2), 149–165. <https://doi.org/10.2146/ajhp060181>
- Vemula, S., Zhao, J., Liu, J., Wang, X., Biswas, S., & Hewlett, I. (2016). Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses*, 8(4), 96. <https://doi.org/10.3390/v8040096>
- Vijgen, L., Moës, E., Keyaerts, E., Li, S., & van Ranst, M. (2008). A *Pancoronavirus RT-PCR Assay for Detection of All Known Coronaviruses* (pp. 3–12). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-181-9_1
- Wille, M., Harvey, E., Shi, M., Gonzalez-Acuña, D., Holmes, E. C., & Hurt, A. C. (2020). Sustained RNA virome diversity in Antarctic penguins and their ticks. *The ISME Journal*, 14(7), 1768–1782.
- Wille, M., & Holmes, E. C. (2020). Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(5), 631–644. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa026>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y., & Yuen, K.-Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 234(10), 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- World Health Organization. (2022, March 15). *Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. <https://Covid19.Who.Int/>.
- Yang, J., Liu, S., Du, L., & Jiang, S. (2016). A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action. *Reviews in Medical Virology*, 26(4), 242–250. <https://doi.org/10.1002/rmv.1879>
- Yuan, H.-W., & Wen, H.-L. (2021). Research progress on coronavirus S proteins and their receptors. *Archives of Virology*, 166(7), 1811–1817. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05008-y>

13. APÉNDICE

Apéndice 1: distribución de muestras ambientales obtenidas de la ECA57.

Grupo Muestras						Grupo Muestras					
1	43	58	68	8	77	14	46	97	97.1	38	52.1
					PG			F	Cor		F
2	25	33	65	35	57	15	54.1	89.1	61.1	87	31
				CA	F						
3	43.1	68.1	7	4	61	16	10	99.1	26	95	56.1
							CA				
4	14	72	5	17	81	17	88.1	98.1	70	78	-
	F										F
5	27	69	94	98	41	18	2	3	4	5	6
					PG						F
6	8.1	62	64	84	51	19	7	9	10	12	13
	F										
7	66	45	94.1	48	56	20	15	16A	16B	17	19
				PG			PG	PG			
8	96	52	91	67	47	21	21	22	23	24	25
										F	PG
9	63	79	80	81.1	90	22	26	27	28	29	31
10	55	73	76	64.1	91.1	23	32	33	34	35	37
							CA				
11	79.1	59	90.1	9	80.1	24	38	39	44	53A	53B
					F		PG				PG
12	40	99	66.1	45.1	54	25	60	71	74	75	82
			CA	PG			PG	CA		CA	
13	89	42	19	88	47.1						

Las muestras se encuentran divididas dentro de 25 grupos. PG: Petrel gigante; CA: Chionis albus; Cor: Cormorán; F: Foca de Weddell