



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GEN DE LA NEURAMINIDASA EN
EL VIRUS INFLUENZA A DE ORIGEN PORCINO DURANTE LOS
AÑOS 2013-2014.**

Victoria Carla García Reyes

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Víctor Manuel Neira Ramírez
Universidad de Chile
Financiamiento Proyecto Fondef ID14I10201

SANTIAGO, CHILE
2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GEN DE LA NEURAMINIDASA EN
EL VIRUS INFLUENZA A DE ORIGEN PORCINO DURANTE LOS
AÑOS 2013-2014.**

Victoria Carla García Reyes

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final:

Prof. Guía: Víctor Manuel Neira Ramírez

Profesor Corrector: Patricio Retamal M.

Profesor Corrector: Sergio Bucarey V.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a todos aquellos que me ayudaron a llevar a cabo la realización de esta memoria de título.

Al Dr. Víctor Neira Ramírez, quien me brindó muchas oportunidades, me enseñó y siempre tuvo la disposición de atender mis dudas.

Al Dr. Rafael Medina Silva y su equipo de trabajo, pertenecientes al Centro de Investigaciones Médicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile por recibirme en sus dependencias para lograr parte importante de los objetivos propuestos en esta memoria.

Al proyecto Fondef ID14I10201, de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Conicyt), por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta memoria de título.

Al Dr. Patricio Retamal y el Dr. Sergio Bucarey, quienes me ayudaron a la realización de esa memoria a través de sus consejos y correcciones.

A Rodrigo Tapia, quien me enseñó incondicionalmente durante el trabajo de laboratorio, me guió y me apoyó en el proceso de elaboración de tesis y en el trabajo diario.

A todos quienes conocí durante la realización de esta memoria, pertenecientes al Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y al Departamento de Medicina Preventiva, que contribuyeron al gran ambiente de trabajo y siempre me brindaron apoyo.

A mis familiares y amigos, que siempre tuvieron palabras de aliento y me brindaron apoyo incondicional durante todo el proceso.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
Obtención y procesamiento de muestras.....	7
RT-PCR en tiempo real.....	8
Aislamiento viral.....	9
Secuenciación.....	10
Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	11
RESULTADOS.....	13
Identidad de los segmentos secuenciados.....	14
Análisis filogenético.....	15
Discusión.....	24
Conclusión.....	28
Bibliografía.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Número de muestras según empresa, granja y región geográfica...	7
Tabla N°2. Número de muestras aisladas y secuenciadas según empresa, granja y región geográfica	14
Tabla N°3. Identificación de virus seleccionados, subtipo y secuencias con mayor identidad obtenidas en BLAST y su linaje.....	16
Tabla N°4. Subtipos virales y clústeres de NA según empresa.....	21
Tabla N°5. Porcentaje de subtipos virales según empresa.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. RT-PCR multisegmento.....	13
Figura N°2. Árbol filogenético de N1.....	17
Figura N°3. Clúster Pandémico de N1.....	18
Figura N°4. Árbol filogenético de N2.....	19
Figura N°5. Clúster Chileno de N2.....	20
Figura N°6. Distribución geográfica de subtipos virales.....	23

RESUMEN

El virus influenza A (IAV) de origen porcino posee gran importancia en salud pública y salud animal. IAV posee gran variabilidad genética y antigénica, lo cual es muy importante dentro de su patogenia. Este estudio consistió en determinar la variabilidad genética del gen de la neuraminidasa (NA) en virus aislados de planteles porcinos de producción intensiva entre los años 2013 y 2014. Para esto, se analizaron 1167 muestras desde 25 granjas mediante aislamiento viral, RT-PCR en tiempo real y secuenciación por Next Generation Sequencing, obteniéndose 41 secuencias genómicas de NA pertenecientes al 50% de las empresas muestreadas. Se determinó la presencia de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 circulando en los planteles chilenos, específicamente en la Región de Valparaíso, Región Metropolitana, Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, Región del Maule y Región del Biobío, confirmando la gran diseminación de IAV en porcinos de Chile. Del total de secuencias de NA, 17 correspondieron a N1, las que fueron agrupadas dentro del clúster N1 pandémico, evidenciando múltiples introducciones del virus a la especie porcina. Por otro lado, 24 secuencias correspondieron a N2. La mayoría de éstas se agruparon en un clúster monofilético, que fue designado como "N2 chileno", el cual resultó ser distinto a aquellos encontrados en otros países y evidenciaban una introducción única a la población de cerdos chilenos. Se observó también la presencia de distintas variantes virales dentro de una misma empresa y la presencia de una misma variante en empresas distintas. Estos resultados permitieron conocer la realidad de IAV y específicamente la diversidad de NA.

Palabras clave: Influenza, neuraminidasa, diversidad, porcino.

ABSTRACT

Swine origin influenza A virus (IAV) is an important concern in both public and animal health. IAVs have shown high genetic and antigenic diversity, which is very important for the viral pathogenesis. The aim of this study was to determine the neuraminidase gene (NA) genetic variability in IAVs obtained from intensive swine farms, during 2013 to 2014. One thousand one hundred sixty-seven samples from 25 swine farms were tested by viral isolation, real time RT-PCR and sequenced by Next Generation Sequencing. A total of 41 NA sequences were obtained, representing 50% of the swine farms in study. H1N1, H1N2 and H3N2 subtypes were detected in Valparaíso, Metropolitan, Libertador General Bernardo O'Higgins, Maule and Biobío Regions, confirming the wide spreading of IAV in intensive swine farms in Chile. Seventeen viral sequences belonged to N1 subtype. All of them were grouped into the pandemic N1 cluster, and the tree topology suggests multiple introductions of the virus into swine population. The rest of the sequences belonged to N2 subtype. Most of them were grouped into a monophyletic cluster, named "Chilean N2". This cluster was not close related with viruses previously described, suggesting a unique introduction into the swine population. At farm level, was observed the presence of more than one IAV variant and the presence of a determined variant circulating in several farms. These results could help to understand the influenza A virus dynamic in swine in Chile.

Keywords: Influenza, neuraminidase, diversity, swine.

INTRODUCCIÓN

El virus influenza A (IAV, por sus siglas en inglés) corresponde a un virus ARN segmentado de hebra simple y sentido negativo, perteneciente a la Familia *Orthomyxoviridae* y Género *Orthomyxovirus*. (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014; Cox *et al.*, 2000; Fenner y Maurin, 1976).

Este ARN está dividido en 8 segmentos que codifican para diversas proteínas; sin embargo, estos virus se clasifican de acuerdo a la diversidad genética y antigénica de dos glicoproteínas de superficie que posee, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), siendo descritos 18 tipos de HA y 11 de NA (Freidl *et al.*, 2014; Shrauwen y Fouchier, 2014; Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014).

La combinación de estas glicoproteínas da origen a distintos subtipos virales. Las aves Anseriformes son consideradas reservorios naturales del virus, detectándose todos los subtipos en ellas, con excepción de H17, H18, N10 y N11 los cuales fueron recientemente detectados en murciélagos en Guatemala y Perú. En el caso de la especie porcina, los subtipos virales circulantes más reconocidos son H1N1, H1N2 y H3N2 (Freidl *et al.*, 2014; Shrauwen y Fouchier, 2014).

Dada la naturaleza segmentada del IAV, cuando dos o más virus infectan una misma célula puede ocurrir un intercambio de sus segmentos de ARN. Si este intercambio se produce en las glicoproteínas HA y NA se produce lo que se conoce como cambio antigénico o *antigenic shift*, permitiendo la creación de nuevos subtipos virales con alta transmisibilidad a otros hospederos, entre ellos, el humano (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014). Esto ocurre comúnmente en la especie porcina, en donde el cerdo funciona como “vaso mezclador” de influenza debido a la expresión de receptores aviares y humanos en células epiteliales del aparato respiratorio, los receptores α -2,3 y α -2,6, respectivamente (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014; Urbaniak *et al.*, 2014). A pesar de haber evidencia de la transmisión de influenza aviar a la población porcina, estudios recientes han determinado que el cerdo posee menor cantidad de receptores aviares que humanos en su epitelio, generando cuestionamientos acerca de la manera en la que se traspasa esta barrera interespecie (Urbaniak *et al.*, 2014).

Este reordenamiento genético o *reassortment* no sólo permite la transmisión del virus entre especies distintas por la adaptación de éste al hospedero, sino también la generación de virus reordenados para los que la población podría carecer de inmunidad, obteniendo potencial pandémico (Dlugolenski *et al.*, 2015). A lo largo de la historia moderna, específicamente desde principios del siglo XX, se han identificado 4 pandemias importantes, siendo 3 de ellas el resultado de reordenamientos (Dlugolenski *et al.*, 2015; Shrauwen y Fouchier, 2014; Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014). La primera pandemia se produjo en 1918, causada por un subtipo H1N1 probablemente originado de un virus aviar y causando la muerte aproximada de 50 millones de personas alrededor del mundo (Shrauwen y Fouchier, 2014). La segunda pandemia corresponde a la pandemia asiática de 1957, siendo el responsable un virus H2N2 que provocó 2 millones de muertes en el mundo. Este virus fue producto de un reordenamiento entre virus humanos y aviares (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014), siendo los genes de HA, NA y PB1 aportados por un virus aviar H2N2 y los demás segmentos por un H1N1 (Shrauwen y Fouchier, 2014). Posteriormente, en 1968, apareció un nuevo virus en Hong Kong, de subtipo H3N2. Este virus también fue producto de un reordenamiento entre virus aviares y humanos, siendo los segmentos de HA y PB1 del H2N2 anterior reemplazados por los de otro virus aviar (Shrauwen y Fouchier, 2014; Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014). Este virus H3N2 se volvió endémico después del brote, siendo prevalente en la actualidad en conjunto con los H1N1, mientras que el H2N2 de 1957 desapareció (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014).

En 2009, un nuevo virus H1N1 fue detectado en México, desde donde se diseminó por todo el mundo en unos pocos meses en la especie humana. Este virus fue el resultado de una mezcla entre un IAV de origen porcino perteneciente a un linaje euroasiático, el cual aportó los genes de NA y de matriz (M), y un IAV triple reordenado porcino cuyo origen fue el reordenamiento entre virus humano H3N2, aviar y porcino clásico (Shrauwen y Fouchier, 2014; Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014). Este virus H1N1 pandémico humano del año 2009 se ha vuelto enzoótico en la población porcina y ha continuado su reordenamiento con otros IAV. Un ejemplo de esto es la variante del virus H3N2 (H3N2v) encontrado en humano, la cual posee el gen M del virus H1N1 pandémico, respaldando la idea de que el continuo reordenamiento de un virus podría, eventualmente, facilitar la transmisión hacia el humano (Shrauwen y Fouchier, 2014). No sólo eso, sino que también se ha descrito que el

virus aviar H9N2 y el H5N1 podrían considerarse como los responsables de la próxima pandemia, debido a que su coexistencia con el H1N1 pdm09 permitiría la transmisión entre la especie humana por reordenamiento genético (Shrauwen y Fouchier, 2014; Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014). La capacidad del IAV para generar tanto pandemias como epidemias ha resultado en 3 a 5 millones de casos severos de enfermedad y hasta 500.000 muertes a nivel mundial (Shrauwen y Fouchier, 2014).

Además de los fenómenos anteriormente descritos, el IAV también está sujeto a otro tipo de evolución, denominado deriva antigénica o *antigenic drift*, mediante el cual los virus experimentan mutaciones puntuales en el genoma de HA y NA permitiéndoles evadir la respuesta inmune del hospedero (Shrauwen y Fouchier, 2014).

La naturaleza compleja del virus influenza ha generado dificultades en cuanto al desarrollo de vacunas eficaces para controlar la enfermedad en planteles porcinos, debido a que una sola vacuna estandarizada no se adecua a la situación epidemiológica de todos los planteles por la gran variabilidad en los subtipos virales existentes (CDC, 2015). Además, la inmunidad natural que es desarrollada debido a una infección de campo podría no tener una reacción cruzada con un subtipo distinto al que se encuentra circulando. Este fenómeno en una población humana sin inmunidad podría desencadenar una de las grandes pandemias mencionadas anteriormente. Un ejemplo de esto lo constituye el subtipo H1N1 pandémico de 2009 que, al contrario de lo que se pensaba, no generó inmunidad cruzada para otros virus H1N1 circulantes en otras regiones del mundo, causando infecciones zoonóticas en España y Suiza (Vincent *et al.*, 2014).

Con respecto a las cepas de cerdos en otros países, éstas poseen una gran variabilidad genética y antigénica, siendo Estados Unidos donde más se ha estudiado esta variabilidad. El subtipo H1 es el más variable, dentro del cual se describe la presencia de 4 clústeres (grupos genéticamente similares) conocidos como H1 α , H1 β , H1 γ y H1 δ . El gen que codifica para la HA del subtipo H3 también ha sido clasificado en 4 clústeres, designados del I al IV (Hause *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2009). A nivel de granja se ha demostrado la presencia de distintos IAV en diferentes épocas del año e incluso de forma simultánea. Un ejemplo de esto lo constituye un estudio realizado en Estados Unidos, en el cual se

demonstró una gran variabilidad, observándose la presencia de pH1N1, H1N1, H1N2, H3N2, H1N2v y H3N2v (Corzo *et al.*, 2013).

Si bien existen estudios de análisis filogenéticos alrededor del mundo, en América Latina corresponden a investigaciones recientes (Nelson *et al.*, 2015a). El virus influenza A ha sido estudiado mayoritariamente en Argentina y Brasil. En Argentina, se determinó la presencia de influenza A H1N1 pandémico de 2009 en una granja de cerdos, analizando tanto la HA como la NA. El estudio concluyó que el gen que codifica para la HA en estos virus provenía de virus clásicos porcinos, mientras que el segmento de NA provenía de virus de linaje euroasiático y correspondía a un N1 pandémico (Pereda *et al.*, 2010; Pereda *et al.*, 2011). Otro estudio realizado en 9 granjas de cerdos en Argentina confirmó la presencia de los virus H1N1 pandémicos, pero también hay circulación de virus H1N1 clúster δ , H1N2 clúster δ y H3N2 en las granjas porcinas (Cappuccio *et al.*, 2011; Dibárbora *et al.*, 2013). En relación a Brasil, los estudios indican que el virus H1N1 pandémico está circulando ampliamente en los planteles porcinos, al igual que los H1N2 y H3N2 (Nelson *et al.*, 2015b; Schmidt *et al.*, 2014).

En Chile, posterior al brote de influenza A H1N1 pandémico de 2009, se enfatizó en el estudio de la evolución genética del virus. Los resultados indicaron que los virus que causaron el brote de influenza humana en Chile en 2009 provenían de grupos epidemiológicos distintos y que para ese entonces ya estaban emergiendo diferencias genéticas entre los virus circulantes (Fasce *et al.*, 2011). Sin embargo, la información en cuanto al virus en la especie porcina de Chile sigue siendo escasa, específicamente en relación a la NA (Nelson *et al.*, 2015a).

Al igual que la glicoproteína HA, la NA es un importante antígeno de superficie que le confiere al virus la capacidad de desligarse del receptor celular, facilitando la liberación y replicación viral. Así como HA, NA también está sujeta a *shift* y *drift* antigénico, lo que determina la importancia de estudiar y analizar dicha glicoproteína (Halbherr *et al.*, 2014). A pesar de que HA y NA poseen especificidad por tipos de receptores distintos, se ha descubierto que el gen de la NA en el virus H1N1 pdm09 presenta un perfil enzimático diferente al ser capaz de hidrolizar eficientemente tanto al receptor α -2,3 como α -2,6 (Hu, 2015). Las mutaciones aminoacídicas que aparecen en el genoma de la NA cobran

importancia, debido a que muchas de ellas afectan la sensibilidad a inhibidores de la NA y resistencia a ciertos medicamentos (Espínola, 2012).

Considerando que aún existe desconocimiento acerca de la evolución genética del virus influenza en el territorio nacional y que la capacidad de reordenamiento de éstos representa un gran impacto a la salud pública, esta memoria de título se desarrolla en base a la necesidad de conocer la historia y la evolución genética del virus en Chile, mediante aislamiento y secuenciación de algunos subtipos presentes en distintos planteles porcinos del país, con el objetivo de llevar a cabo un análisis filogenético que permita evaluar la variabilidad del gen NA en planteles de producción intensiva en comparación con cepas aisladas en distintas partes del mundo y relacionando la presencia de éstos a nivel de granja, siendo la NA una glicoproteína de superficie muy poco estudiada y de gran importancia en el reordenamiento genético de los IAV.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genética del gen NA de influenza A de muestras de origen porcino obtenidas entre los años 2013 a 2014 en Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la variabilidad genética del gen NA en aislados chilenos de virus influenza A de origen porcino.
2. Describir variantes genéticas de NA de los aislados chilenos de virus influenza A de acuerdo a la presencia de estos a nivel de empresa, granja y distribución geográfica.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras que se utilizaron fueron obtenidas entre los años 2013 y 2014 desde 25 granjas diferentes, correspondientes a 22 empresas productoras de cerdos a nivel nacional denominadas de la A a la V por motivos de confidencialidad, las cuales se caracterizan por tener un tamaño mayor a 1000 hembras y representar cerca del 95% de la producción porcina intensiva nacional. En cada visita se obtuvieron muestras individuales (mínimo 10 hisopos nasales) y/o muestras grupales (mínimo 5 fluidos orales). Todos los animales muestreados correspondieron a cerdos con sintomatología respiratoria, independiente de su edad o etapa productiva. En total, se obtuvo 1167 muestras provenientes de empresas ubicadas en distintas regiones del país, detalladas en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Número de muestras según empresa, granja y región geográfica.

N°	Empresa	Granja	Región	Muestras
1	A	1	Metropolitana	25
		2	Metropolitana	78
		3	Valparaíso	67
		4	Libertador B. O'Higgins	25
2	B	1	Biobío	30
3	C	1	Metropolitana	32
4	D	1	Metropolitana	39
5	E	1	Araucanía	5
6	F	1	Libertador B. O'Higgins	84
7	G	1	Libertador B. O'Higgins	222
8	H	1	Libertador B. O'Higgins	50
9	I	1	Metropolitana	30
10	J	1	Metropolitana	58
11	K	1	Metropolitana	77
12	L	1	Metropolitana	15
13	M	1	Biobío	12
14	N	1	Metropolitana	23
15	O	1	Libertador B. O'Higgins	94
16	P	1	Libertador B. O'Higgins	30
17	Q	1	Libertador B. O'Higgins	8
18	R	1	Biobío	29
19	S	1	Libertador B. O'Higgins	34
20	T	1	Libertador B. O'Higgins	30
21	U	1	Maule	30
22	V	1	Biobío	40
Total	22	25	6	1167

Las muestras fueron obtenidas mediante hisopos introducidos en ambos orificios nasales que luego fueron conservados en tubos con 2 mL de medio de transporte viral o SIV (Medio Mínimo Esencial, Tripsina TPCK 1X, 0,3% de Seroalbúmina bovina y 1% de solución antibiótica-antimicótica que contiene penicilina, estreptomicina y anfotericina B) para facilitar la mantención del virus previo al diagnóstico. Los fluidos orales se obtuvieron a través de cuerdas de algodón sujetas a los corrales, las cuales son intensamente mordidas por los animales, para posteriormente recolectar y depositar la muestra en tubos de 15 mL. Todas las muestras fueron correctamente identificadas y transportadas al Laboratorio de Virología del Departamento de Medicina Preventiva en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile o al Laboratorio de Virología Molecular, del Departamento de Infectología e Inmunología Pediátrica, en el Centro de Investigaciones Médicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile en contenedores con bolsas de hielo para mantener la temperatura.

En el laboratorio, los fluidos orales obtenidos fueron centrifugados a 5000 rpm por 20 minutos en una centrífuga Biofuge Primo R de Heraeus con el fin de separar y eliminar las partículas de mayor tamaño. Para el procesamiento de los hisopos nasales, las muestras fueron agitadas con vórtex por 15 segundos para disolver en el medio cualquier resto de muestra presente en la tórula. Posterior al procesamiento, todas las muestras fueron alicuotadas en microtubos de 1.500 µL, apartando 200 µL para aislamiento viral y 150 µL para la extracción de ARN. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

RT-PCR en tiempo real

Las muestras procesadas fueron sometidas a un proceso de extracción de ARN viral, mediante el protocolo TRIzol® Reagent (Thermo Fischer Scientific Inc.) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído el material genético se realizó la técnica de RT-PCR en tiempo real con el objetivo de amplificar el segmento M1 del virus influenza A. Para esto, se utilizaron los partidores InfA Forward (5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC -3'), InfA Reverse (5'-AGGGCATTYTGACA AAKCGTCTA -3'), y la sonda InfA Probe (5'-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG -3') (WHO, 2009). La mezcla maestra consistió en 1 µL (400 nM) de InfA Forward, 1 µL

(400 nM) de InfA Reverse, 0,3 µL (120 nM) de InfA Probe, 12,5 µL de 2X RT-PCR Buffer (AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit, Applied Biosystems), 1 µL de 25X RT-PCR Enzyme mix (AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit, Applied Biosystems) y 4,2 µL de agua ultrapura. Se agregó 5 µL de ARN, dando un total de 25 µL de volumen de reacción. El programa de termociclado consistió en un periodo de transcripción reversa a 45°C por 10 minutos, un periodo de denaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de denaturación a 95° C por 15 segundos y *annealing*-extensión a 60° C por 45 segundos. El resultado del RT-PCR en tiempo real es expresado en Ct (cycle threshold) determinado para cada muestra, que indica el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral previamente establecido. El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de material genético que exista en la muestra, es decir, mientras más bajo el Ct, hay mayor cantidad de material genético presente. Para el caso de este experimento, las muestras en las que se obtuvo un Ct < a 35 fueron consideradas positivas.

AISLAMIENTO VIRAL

Las muestras obtenidas también fueron inoculadas en células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK). En general, el aislamiento viral se llevó a cabo luego de conocer el resultado de RT-PCR en tiempo real o en paralelo. Para esto, las células fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial suplementado con 4% de suero fetal bovino y 1% de solución antibiótica-antimicótica a 37°C y a 5% CO₂ en placas para cultivo celular de 48 pocillos por 24 horas. Una vez que la monocapa celular alcanzó un 80% de confluencia, ésta fue lavada 2 a 3 veces con PBS suplementado con tripsina TPCK 1X para inocularla con 200 µL de cada muestra por pocillo. La incubación de las placas de cultivo celular fue realizada a 37°C en una estufa de CO₂ y, después de 1 hora de incubación, se aplicó 1 mL de medio SIV para dejar nuevamente incubando durante 72 horas. Las placas fueron revisadas diariamente con el propósito de detectar efecto citopático, el cual se evidencia por la destrucción gradual de la monocapa celular ante la presencia del virus. Las muestras correspondientes a los pocillos que experimentaron efecto citopático fueron reconocidas como positivas. Además, de forma complementaria, se realizó un ensayo de hemaglutinación y un ensayo de inmuno migración rápida, Flu-DETECT® Swine, Synbiotics, para confirmar el aislamiento y determinar el título viral.

Brevemente, el ensayo de hemaglutinación consiste en la dilución sucesiva en base 2 del aislado viral con 50 µL de PBS en una placa de 96 pocillos y posterior incorporación de 50 µL de glóbulos rojos de sangre de pavo al 0,5% en cada pocillo. La aparición de hemaglutinación es indicativo de presencia de un agente hemaglutinante (IAV, en este caso) y permite titularlo en base a la cantidad de pocillos en los que se visualiza hemaglutinación. Por otro lado, Flu-DETECT® Swine, Synbiotics corresponde a una técnica de inmuno migración rápida que detecta antígeno de la nucleoproteína p56 del virus influenza A, presentando una correlación con aislamientos virales de 95,8% y evidenciando positividad mediante la aparición de dos líneas rojas en la tira de reacción, representando la migración de un complejo antígeno-anticuerpo.

Los aislados fueron re-analizados mediante RT-PCR en tiempo real para la confirmación de la presencia del virus.

SECUENCIACIÓN

Los aislados en los que se obtuvo un Ct < a 30 (a lo menos un aislado por plantel), fueron escogidos para realizar la amplificación del genoma completo mediante un RT-PCR multisegmento (Zhou *et al.*, 2009) en donde el ADN complementario fue sintetizado utilizando los partidores MBTuni-12:5' ACG CGT GAT CAG CRA AAG CAG G 3' y MBTuni-13: 5' ACG CGT GAT CAG TAG AAA CAA GG 3', Superscript III First Strand Synthesis SuperMix de Invitrogen y la enzima High Fidelity DNA Polymerase (Agilent, Santa Clara, USA). El programa de termociclado consistió en 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 30 segundos y 68°C por 3 minutos y 31 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 68°C por 3 minutos. Posteriormente, los productos de PCR fueron cargados en gel de agarosa al 1,5% utilizando la técnica de electroforesis y luego fueron visualizados como bandas mediante luz ultravioleta.

Se realizó la purificación de los amplicones desde el gel de agarosa mediante el kit "HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit" de RBC Bioscience, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para esto, se realizó un corte en la porción del gel que contiene los fragmentos de ADN de interés y se incubó a 55°C por 10 a 15 minutos, para posteriormente ser filtrado mediante centrifugación utilizando columnas de filtrado. Esta

etapa de filtrado permitió la unión del ADN al filtro de la columna, el cual fue lavado con solución buffer de lavado y finalmente eluído, obteniendo un volumen de elusión final de 20 a 50 μL .

El desarrollo de esta etapa se realizó con la colaboración del Dr. Rafael Medina Silva, profesor asistente en el Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Infectología e Inmunología pediátrica en el Centro de Investigaciones Médicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Una vez realizada la extracción de ADN desde el gel purificado, este producto fue enviado al Center for Research on Influenza Pathogenesis (CRIP) en la Mount Sinai School of Medicine, en Nueva York para su secuenciación. La secuenciación se realizó con la tecnología Next Generation Sequencing, mediante Illumina (Rutvisuttinunt, 2013). El resultado de la secuenciación fue el genoma completo de cada uno de los virus; sin embargo, para propósitos de este proyecto solo se trabajó con el segmento NA para análisis filogenético y para propósitos de subtipificación se utilizó también el segmento de HA sin analizar filogenéticamente.

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Una vez obtenidas las secuencias, se utilizó BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con el objetivo de confirmar que efectivamente el segmento correspondía al gen NA y de identificar las secuencias más cercanas disponibles en la base de datos para cada uno de los segmentos NA obtenidos, ya sean éstas de origen porcino, aviar o humano. Luego, las secuencias fueron alineadas entre sí utilizando el software MEGA (v6.0) y se incorporaron al análisis secuencias de referencia del gen NA de virus influenza A de origen porcino encontradas en la literatura, las cuales fueron obtenidas como archivo fasta a través de GenBank e Influenza Research Database. Para el análisis filogenético, se utilizó el software jModelTest para evaluar el modelo que mejor se ajustaba a los datos, permitiendo generar un árbol confiable. Cabe destacar que se exploró con varios modelos sugeridos por JModelTest para el análisis de N1 y N2 de forma independiente, lo que permitió escoger el más adecuado. Para la clasificación de los clúster de NA descritos en el cerdo, se realizó

una revisión en la literatura existente y finalmente se utilizó como referencia lo descrito por Vincent *et al.* 2009 y Ali *et al.*, 2012.

Dependiendo de los resultados, las secuencias fueron identificadas dentro de clústeres o se presentaron como secuencias únicas (*singleton*) en el árbol filogenético, y también se analizaron las secuencias mediante distancia p en MEGA (v6.0) para determinar la distancia genética entre ellas. Una vez identificadas las variantes del gen NA, éstas fueron agrupadas de acuerdo a su empresa y granja de origen, considerando la ubicación geográfica de éstas. Conociendo estos datos se pudo determinar el comportamiento de estas variantes de NA en el territorio nacional, observando si existe más de una variante presente en una empresa, o si empresas de una misma localización geográfica comparten variantes similares, ya sea por cercanía entre granjas o movimiento de animales entre ellas. Esto permitió comprender, a través de una aproximación descriptiva, la manera en que el virus se está adaptando a la realidad nacional y cómo va divergiendo en Chile.

RESULTADOS

De un total de 1167 muestras, 249 (21,3%) fueron positivas al virus influenza A mediante RT-PCR en tiempo real. De estas, 137 (11,7% del total) evidenciaron efecto citopático al aislamiento viral en células MDCK y fueron confirmadas mediante las técnicas descritas anteriormente. En relación al RT-PCR multisegmento, se obtuvieron 39 aislados (3,34% del total de muestras) con una concentración de material genético óptima para ser enviados a secuenciar, correspondiente al 28,4% de las muestras positivas a aislamiento (Figura N° 1). De los 39 aislados enviados a secuenciar se obtuvieron 41 genomas de IAV debido a que dos aislados correspondían a infecciones mixtas de dos virus distintos, los que corresponden a VN1401-41 (H1N1 y H1N2) y VN1401-587 (H1N1 y H3N2). Los aislados

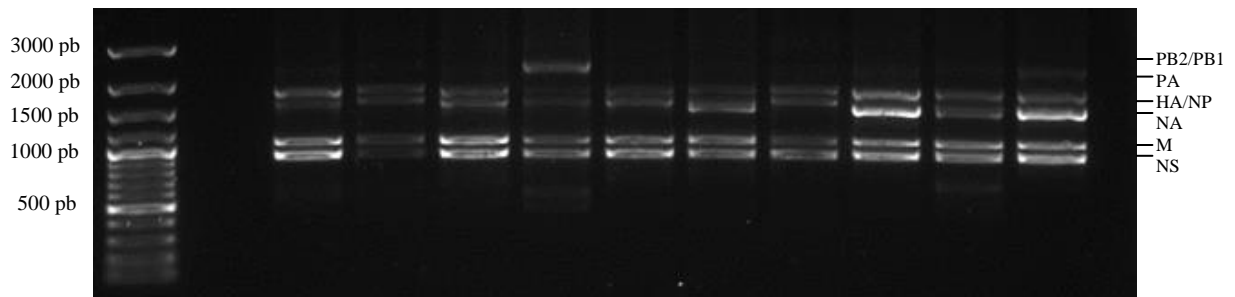


Figura N°1. RT-PCR multisegmento. El carril 1 corresponde al estándar de pares de bases, el carril 2 al control negativo y los carriles 3 al 13 corresponden a amplificaciones de virus porcinos, observándose los diferentes segmentos de influenza.

secuenciados pertenecen al 50% de las empresas muestreadas, correspondiendo a: A, B, F, G, J, K, L, M, O, T y U, cuyas localizaciones geográficas corresponden a la Región Metropolitana, Región de Valparaíso, Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, Región del Maule y Región del Biobío. De todas las empresas desde donde se obtuvo aislados de IAV se logró obtener secuencias, excepto la granja P. La información de los aislados y los resultados se detalla en la Tabla N°2.

Tabla N°2. Número de muestras aisladas y secuenciadas según empresa, granja y región geográfica.

N°	Empresa	Granja	Región	RT-PCR	Aislados	Secuenciados
1	A	1	Metropolitana	25	0	0
		2	Metropolitana	47	27	1
		3	Valparaíso	32	11	3
		4	Libertador B. O'Higgins	22	2	2
2	B	1	Biobío	14	3	2
3	C	1	Metropolitana	10	0	0
4	D	1	Metropolitana	7	0	0
5	E	1	Araucanía	2	0	0
6	F	1	Libertador B. O'Higgins	17	15	5
7	G	1	Libertador B. O'Higgins	21	25	9
8	H	1	Libertador B. O'Higgins	2	0	0
9	I	1	Metropolitana	0	0	0
10	J	1	Metropolitana	2	2	2
11	K	1	Metropolitana	1	1	1
12	L	1	Metropolitana	2	1	1
13	M	1	Biobío	12	1	1
14	N	1	Metropolitana	0	0	0
15	O	1	Libertador B. O'Higgins	13	31	5
16	P	1	Libertador B. O'Higgins	2	2	0
17	Q	1	Libertador B. O'Higgins	2	0	0
18	R	1	Biobío	0	0	0
19	S	1	Libertador B. O'Higgins	0	0	0
20	T	1	Libertador B. O'Higgins	14	13	6
21	U	1	Maule	2	3	1
22	V	1	Biobío	0	0	0
Total	22	25	6	249	137	39

Identidad de los segmentos secuenciados

El análisis mediante BLAST permitió la identificación de los segmentos de NA en los subtipos N1 y N2, representando el 41,46% y 58,53% del total de secuencias, respectivamente. Para el mejor entendimiento de los resultados, también se utilizó el resultado de la secuenciación para el gen HA, identificando los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2, representando el 41,46%, 53,55% y 4,87% del total de secuencias, respectivamente. Las secuencias más cercanas reportadas por BLAST para los segmentos N1 siempre correspondieron a virus del linaje N1 pandémico del 2009 (H1N1), como son A/México City/INER14/2009 y A/Singapore/ON1746/2009. La mayoría de estos virus fueron

identificados en humanos con una identidad de hasta 99%. Por otro lado, las secuencias más cercanas reportadas en BLAST para la totalidad de secuencias N2 correspondieron a secuencias de humano de los 90's, como por ejemplo A/Netherlands/399/1993, A/New York/776/1993, A/Hong Kong/14/1992 y A/Oslo/2219/1993. Sin embargo, la homología reportada para los N2 chilenos respecto a su secuencia más cercana siempre estuvo entre 92% y 94% de identidad. Muchas de las secuencias encontradas en BLAST eran compartidas entre algunas secuencias chilenas, como es el caso de A/Singapore/ON1746/2009 para los segmentos N1 y A/New York/776/1993 para los segmentos N2. El detalle de lo obtenido en BLAST se especifica en la Tabla N°3.

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, las secuencias de N1 fueron analizadas independientemente de las de N2 debido a las diferencias que existen entre ellas.

Primero, se identificaron los grupos de NA descritos en la literatura y fueron incorporados a los alineamientos. Es así como se identificaron claramente tres clústeres distintos para N1, correspondientes a N1 Pandémico, N1 Humano y N1 Porcino, mientras que para N2 se encontraron 2 clústeres, correspondientes a N2 porcino de origen humano derivado del virus H3N2 y N2 porcino de origen humano derivado del virus H1N2, los cuales han sido encontrados en diferentes partes del mundo. Además, se incorporaron al análisis secuencias relevantes de humano y aves.

Así, fueron incluidas 17 secuencias de N1 correspondientes a 9 granjas y 7 empresas, todas pertenecientes a virus de subtipo H1N1. El alineamiento final, incluyendo referencias, contempló 66 secuencias. La filogenia fue re-construida a través de Maximum Likelihood, utilizando el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985), asumiendo una distribución Gamma. Este análisis se realizó con un bootstrap de mil réplicas (Figura N°2).

Tabla N°3. Identificación de virus secuenciados, subtipo y secuencias con mayor identidad obtenidas en BLAST y su linaje.

Virus	Subtipo	NA en BLAST	Linaje	ID%
A/Swine/Chile/2-7/2013_2013/08/23	H1N1	A/Santiago/p22d1/2011	Pandémico N1	99
A/Swine/Chile/10/2014_2014/06/19	H1N1	A/Thailand/PY08063/2009	Pandémico N1	99
A/Swine/Chile/12/2014_2014/06/19	H1N1	A/Thailand/PY08063/2009	Pandémico N1	99
A/Swine/Chile/14/2014_2014/06/19	H1N1	A/Thailand/PY08063/2009	Pandémico N1	99
A/Swine/Chile/15/2014_2014/06/23	H1N1	A/Singapore/DMS102/2010	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/18/2014_2014/06/29	H1N1	A/Utah/59/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/20/2014_2014/06/19	H1N1	A/Utah/59/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/41/2014_2014/07/22	H1N1	A/Finland/610/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/65/2014_2014/08/21	H1N1	A/swine/Orenburg/ZO/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/66/2014_2014/08/21	H1N1	A/swine/Orenburg/ZO/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/28/2014_2014/07/08	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/29/2014_2014/07/08	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/33/2014_2014/07/21	H3N2	A/Netherlands/738/1989	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/36/2014_2014/07/22	H1N2	A/Oslo/2219/1993	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/37/2014_2014/07/22	H1N2	A/Oslo/2219/1993	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/39/2014_2014/07/22	H1N2	A/Oslo/2219/1993	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/40/2014_2014/07/22	H1N2	A/Oslo/2219/1993	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/42/2014_2014/07/31	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/44/2014_2014/07/31	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/45/2014_2014/07/31	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/47/2014_2014/07/31	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/48/2014_2014/07/31	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/52/2014_2014/07/31	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/59/2014_2014/08/10	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/60/2014_2014/08/10	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/VN1401-263/2014	H1N2	A/Hong Kong/14/1992	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/VN1401-271/2014	H1N2	A/Hong Kong/14/1992	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/VN1401-274/2014	H1N2	A/Hong Kong/14/1992	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/VN1401-336/2014	H1N1	A/Singapore/ON1746/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/VN1401-339/2014	H1N2	A/Netherlands/399/1993	Humano 90's	92
A/Swine/Chile/VN1401-343/2014	H1N2	A/Netherlands/399/1993	Humano 90's	92
A/Swine/Chile/VN1401-367/2014	H1N2	A/New York/776/1993	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/VN1401-04/2014	H1N2	A/Hong Kong/14/1992	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/VN1401-41a/2014	H1N2	A/Hong Kong/14/1992	Humano 90's	93
A/Swine/Chile/VN1401-41b/2014	H1N1	A/Singapore/ON202/2009	Pandémico N1	99
A/Swine/Chile/VN1401-510/2014	H1N1	A/Singapore/ON1852/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/VN1401-571/2014	H1N1	A/México City/INER14/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/VN1401-587a/2014	H3N2	A/Hong Kong/CUHK20010/1997	Humano 90's	94
A/Swine/Chile/VN1401-587b/2014	H1N1	A/México City/INER14/2009	Pandémico N1	98
A/Swine/Chile/VN1401-80/2014	H1N1	A/Singapore/ON202/2009	Pandémico N1	99
A/Swine/Chile/VN1401-82/2014	H1N1	A/Singapore/ON202/2009	Pandémico N1	99

El árbol filogenético agrupa a todas las secuencias chilenas dentro del gran clúster N1 Pandémico, las cuales se encuentran marcadas en rojo. Ninguna secuencia chilena se agrupa con virus N1 de linaje porcino o linaje humano descrito previamente a la aparición de la cepa pandémica H1N1 del 2009. Se calculó la distancia genética entre las variantes chilenas pertenecientes al subtipo N1, tanto para nucleótidos como aminoácidos, correspondiendo a 2% y 3,5%, respectivamente.

Si bien claramente los virus corresponden a N1 pandémicos, éstos no generan un clúster propio de secuencias introducidas en planteles porcinos en Chile, lo cual confirma que corresponde a un grupo polifilético. En algunos casos, las diferentes introducciones estarían relacionadas con la granja afectada y no con la empresa a la cual los virus pertenecen. La empresa A constituye un ejemplo, debido a que todas sus granjas poseen virus diferentes. Por otro lado, distintas empresas poseen los mismos virus, como es el caso de las empresas F y

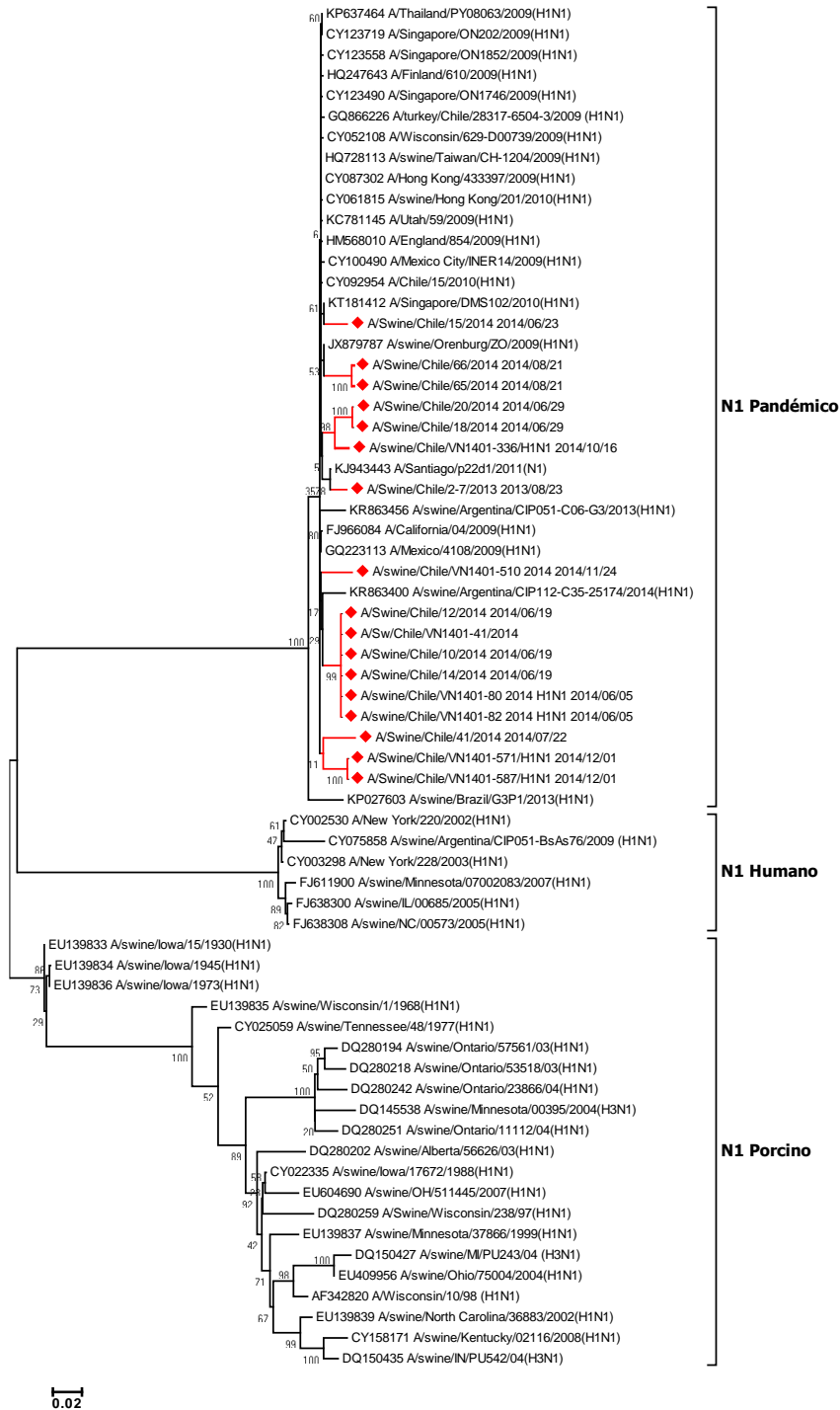


Figura N°2. Árbol filogenético de N1. Rombos rojos identifican virus encontrados en porcinos de Chile.

G (Figura N°3).

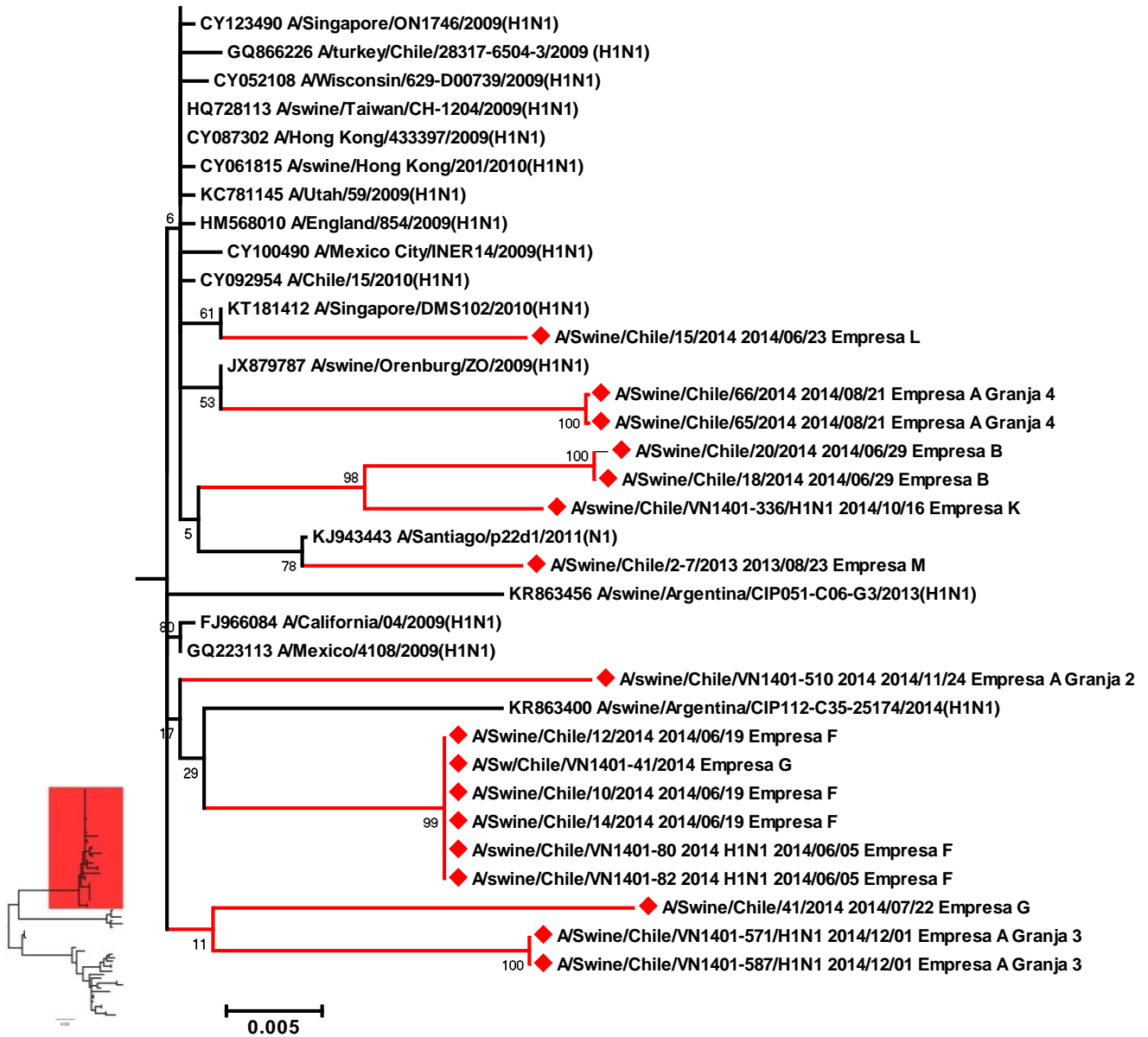


Figura N°3. Clúster Pandémico de N1, que incluye todos los virus chilenos N1 encontrados en porcinos, identificados con código de empresa y granja. Rombos rojos identifican virus encontrados en porcinos de Chile.

En cuanto al análisis de los segmentos N2, 24 secuencias obtenidas desde 6 empresas fueron incluidas, todas pertenecientes a virus de subtipo H1N2, con excepción de dos aislados que corresponden a H3N2.

El alineamiento final, incluyendo referencias, contempló 70 secuencias. La filogenia fue re-construida a través de Maximum Likelihood, utilizando el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985) asumiendo una distribución Gamma. Este análisis se realizó con un bootstrap de mil réplicas (Figura N°4).

El árbol filogenético agrupa la mayoría de las secuencias de N2 (22 secuencias) dentro de un clúster monofilético que no incluye secuencias de otro origen. Todas estas secuencias corresponden a virus H1N2, en donde se sugiere que, en relación al segmento N2, estos virus no están emparentados filogenéticamente a aquellos descritos previamente. Este clúster representa a 5 empresas, lo que indica que posiblemente el virus se haya diseminado entre ellas en algún momento. Al conformar un clúster único se le denominó “clúster N2 Chileno”. Se distingue la presencia de la misma

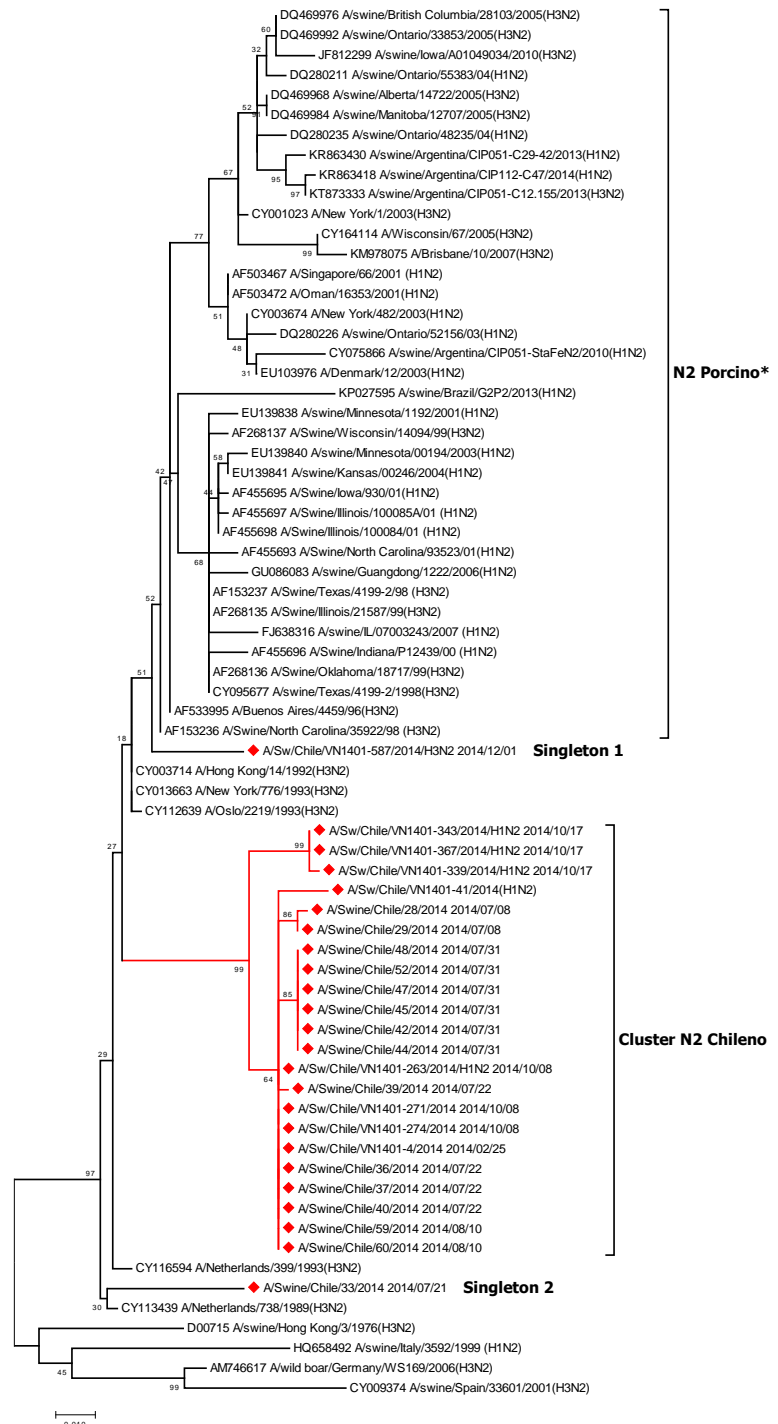


Figura N°4. Árbol filogenético de N2. Rombos rojos identifican virus encontrados en porcinos de Chile. .
*Clúster N2 porcino agrupa secuencias de N2 de origen humano encontradas en cerdos.

variante viral en distintas empresas, como es el caso de la empresa G, J y A (Figura N°5). La distancia genética que se calculó entre los virus N2 chilenos correspondió a 0,9% considerando nucleótidos y 1,5% considerando aminoácidos.

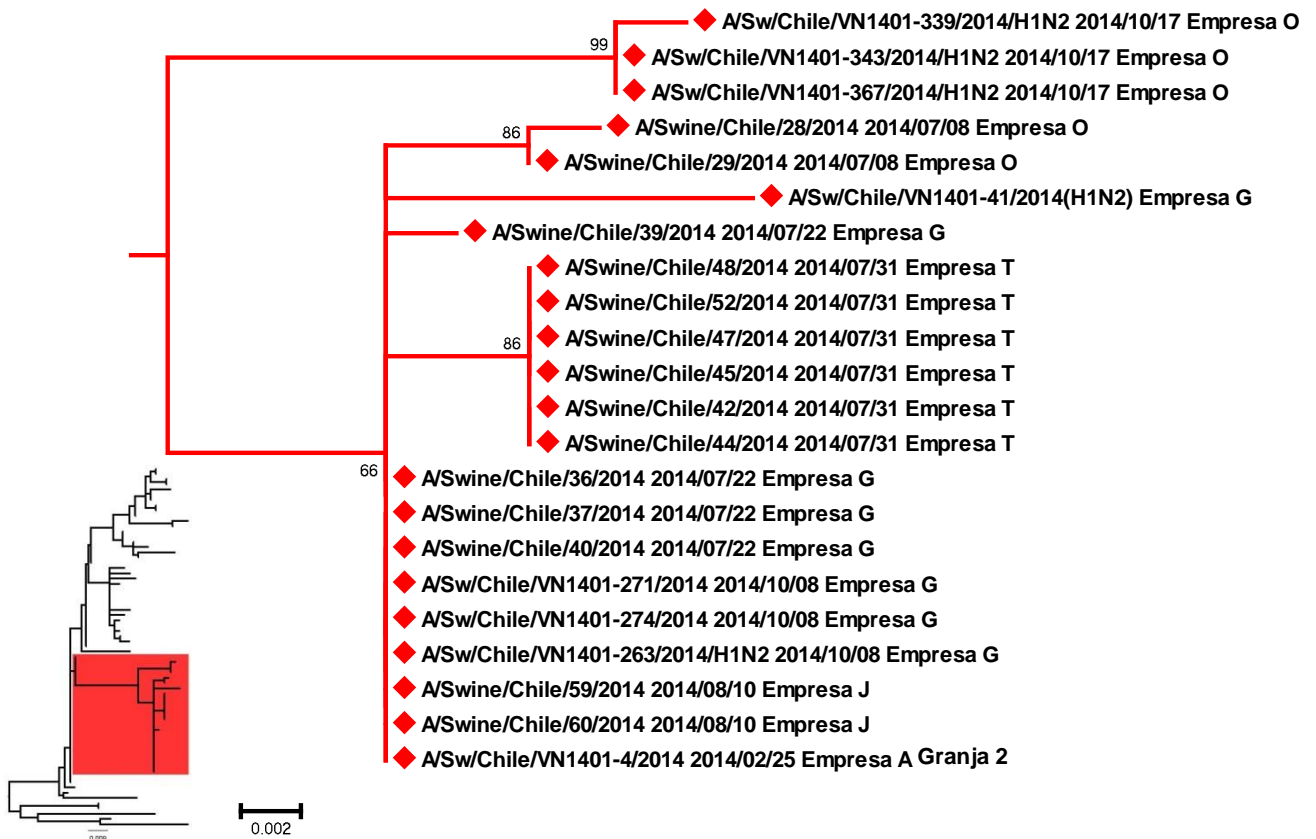


Figura N°5. Clúster Chileno de N2, que incluye todos los virus chilenos N2 encontrados en porcinos, identificados con código de granja, con excepción de los *singletons* VN1401-587 y VN1401-33.

Por otro lado, ambas secuencias N2 provenientes de virus H3N2 corresponden a *singletons** o introducciones únicas, las que tampoco están relacionadas con virus encontrados en porcinos previamente y más bien parecen introducciones directas desde el ser humano. Éstas se encuentran en dos planteles distintos correspondientes a la empresa J y la empresa U, sin poseer similitud o relación genética estrecha entre ellas. En este caso, al parecer estos virus no han sido diseminados a otros planteles ya que no existe mayor evidencia de su presencia.

*Término que describe una posición en el alineamiento en la cual sólo una secuencia posee una base o residuo diferente con respecto a las secuencias restantes (Zvelebil y Baum, 2008).

En resumen, las variantes genéticas del gen NA dentro de las regiones estudiadas corresponden principalmente a clústeres N1 pandémico y N2 chileno (Tabla N°4). Tal como se aprecia en dicha tabla, hay granjas que poseen más de un subtipo viral como es el caso de las Empresas A y G.

Tabla N°4. Subtipos virales y clústeres de NA según empresa

Empresa	Granja	Región	Subtipos	Clúster NA
A	2	Metropolitana	H1N1, H1N2	N1 pandémico, N2 chileno
	3	Valparaíso	H1N1, H3N2	N1 pandémico, <i>Singleton</i> N2
	4	Libertador B. O'Higgins	H1N1	N1 pandémico
B	1	Biobío	H1N1	N1 pandémico
F	1	Libertador B. O'Higgins	H1N1	N1 pandémico
G	1	Libertador B. O'Higgins	H1N1 y H1N2	N1 pandémico y N2 chileno
J	1	Metropolitana	H1N2	N2 chileno
K	1	Metropolitana	H1N1	N1 pandémico
L	1	Metropolitana	H1N1	N1 pandémico
M	1	Biobío	H1N1	N1 pandémico
O	1	Libertador B. O'Higgins	H1N2	N2 chileno
T	1	Libertador B. O'Higgins	H1N2	N2 chileno
U	1	Maule	H3N2	<i>Singleton</i> N2

A excepción de las empresas A y G, todas las empresas poseen sólo un subtipo viral de los aislados secuenciados. Por otro lado, el único aislado secuenciado que provino de la Empresa U corresponde a un subtipo H3N2 que, en el árbol filogenético, corresponde a un *singleton* y no se agrupa con otros N2 chilenos, tal como se menciona anteriormente. Este es el único aislado obtenido desde la Región del Maule. Se calculó la distancia genética entre los virus clasificados como N2 de clúster chileno y aquellos *singletons* de N2, observándose un 5% de distancia en nucleótidos y 10% de distancia en relación a los aminoácidos.

Al estudiar los porcentajes de subtipos virales por empresa, se observó que, si bien las empresas de planteles únicos tenían un solo subtipo en un 100%, las empresas que poseían más de un plantel o aquellas de las cuales se habían obtenido mayor cantidad de muestras presentaban distintos subtipos, lo cual sucedió con la empresa A y la G (Tabla N°5). Cabe mencionar además que algunas empresas que figuran con un 100% de un subtipo determinado poseían sólo una muestra y no significa que ese subtipo sea predominante en esa población. Ejemplo de esto son las empresas K, L, M y U.

Tabla N°5. Porcentaje de subtipos virales según empresa

Empresa	Porcentaje			Secuencias totales
	H1N1	H1N2	H3N2	
A Granja 2	50%	50%	0%	2
A Granja 3	66,66%	0%	33,33%	3
A Granja 4	100%	0%	0%	2
B	100%	0%	0%	2
F	100%	0%	0%	5
G	20%	80%	0%	10
J	0%	100%	0%	2
K	100%	0%	0%	1
L	100%	0%	0%	1
M	100%	0%	0%	1
O	0%	100%	0%	5
T	0%	100%	0%	6
U	0%	0%	100%	1

Con respecto a la distribución geográfica de los distintos NA encontrados, éstos se distribuyen de diferente manera en cada una de las regiones muestreadas. Con respecto a los virus pertenecientes al clúster N1 pandémico, el 52,94% de éstos se encuentran en la Región del Libertador General Bernardo O’Higgins, mientras que en la Región Metropolitana y la Región del Biobío existe un 17,65%. Le sigue en tercer lugar la Región de Valparaíso con un 11,76%. Con respecto a los virus pertenecientes al clúster N2 chileno, éstos se encuentran predominando en la Región del Libertador General Bernardo O’Higgins con un 86,36%. El porcentaje restante se ubica en la Región Metropolitana y dentro de las demás regiones no se aislaron virus correspondientes a este clúster. Los virus pertenecientes a los *singletons* de N2 se aislaron sólo de dos regiones, la Región de Valparaíso y la Región del Maule, en donde sólo se aisló un virus de subtipo H3N2 en cada una (Figura N°6).

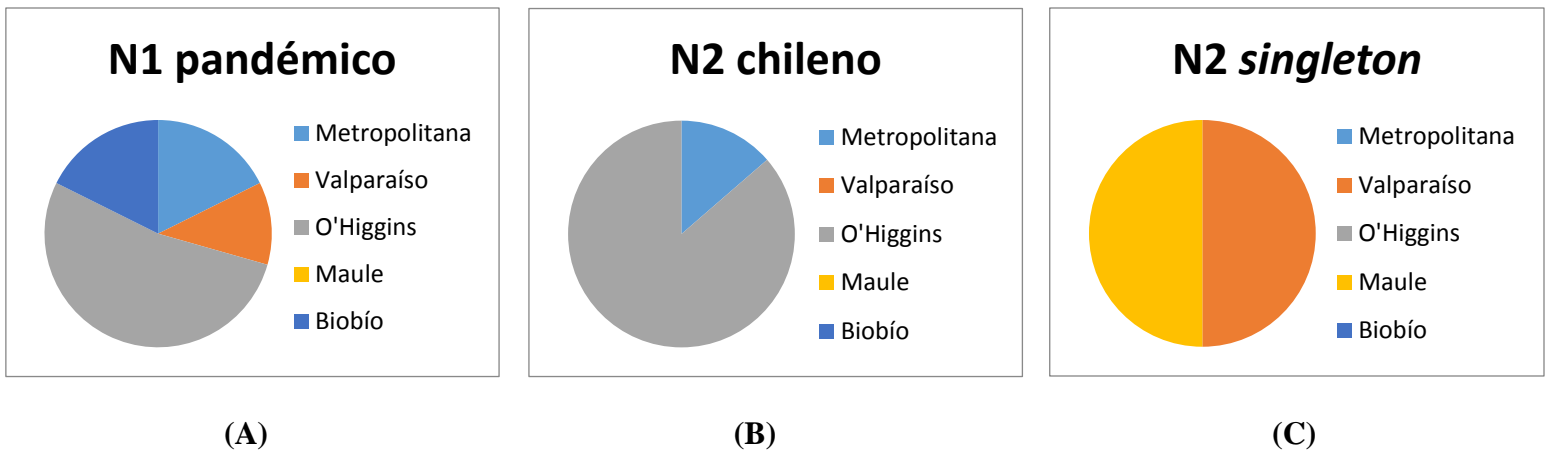


Figura N°6. Distribución geográfica de subtipos virales. (A) Representación de la distribución geográfica de todos los virus pertenecientes a clúster N1 pandémico aislados en este estudio. (B) Distribución geográfica de virus N2 chileno y (C) distribución geográfica para virus *singleton* N2.

DISCUSIÓN

La presente memoria de título permitió entregar mayor conocimiento acerca de las características del virus influenza A de origen porcino en plantales de Chile, específicamente en relación a la diversidad genética del gen que codifica para la NA.

Con respecto a la presencia del virus determinada por RT-PCR, éste se encuentra presente en 77,27% (17/22) de las empresas muestreadas, por lo que se reafirma que el virus influenza A de origen porcino se encuentra de forma endémica en plantales porcinos intensivos del país. Dentro del total de empresas positivas a RT-PCR, se aisló IAV en el 70% (12/17) y la secuenciación fue exitosa en el 92% de éstas (11/12). En otros términos, se obtuvo secuencias desde el 65% (13/20) de las granjas positivas a IAV en este estudio. Algunas muestras positivas a RT-PCR y/o aislamiento no fueron óptimas para la secuenciación, ya que no alcanzaron la concentración viral necesaria.

Se confirmó la presencia de los subtipos típicamente descritos en la especie porcina a nivel mundial, los cuales corresponden a H1N1, H1N2 y H3N2, según lo descrito por Freidl *et al.*, 2014 y Shrauwen y Fouchier, 2014.

Todos los segmentos N1 obtenidos en este estudio presentaron hasta un 99% de identidad con otros virus de linaje N1 pandémico de 2009, la mayoría de éstos provenientes de humano. Este N1 proviene originalmente de un H1N1 de linaje eurasiático, distinto al N1 clásico porcino y al N1 de la gripe estacional humana previo al año 2009 (Webby *et al.*, 2000; Komadina *et al.*, 2014). Se ha descrito que el virus H1N1 pandémico de 2009 se ha diseminado frecuentemente desde el ser humano al cerdo (Nelson *et al.*, 2015c). Los resultados indicarían que los N1 encontrados debieron haberse introducido a las empresas porcinas durante o después de la pandemia de virus influenza A H1N1 en 2009. La forma del clúster pandémico y la distribución polifilética que presentan las secuencias de los virus porcinos chilenos sugiere múltiples introducciones independientes del gen N1 (entre 7 y 9 introducciones estimadas). Si hubiese habido solo una introducción del gen N1 a la población nacional de cerdos, se observaría un gran clúster monofilético evolucionando desde el clúster pandémico internacional. Desde el punto de vista epidemiológico, el hecho de que hayan existido múltiples introducciones independientes tendría gran validez, puesto

que el virus en la especie humana se encuentra altamente diseminado, aumentando el riesgo de transmisión al cerdo.

Por otra parte, los genes N1 chilenos no se agruparon con ningún virus de linaje porcino clásico en el árbol filogenético, lo cual concuerda con los resultados del estudio realizado por Nelson *et al*, 2015a, en el cual se afirma que en Chile no existen virus influenza clásicos porcinos en esta población, resultado que se derivó del estudio del segmento que codifica para la HA, por lo tanto, el comportamiento del gen NA y HA sería similar.

Con respecto a N2, los virus más similares publicados correspondieron a variantes virales de humanos de los años 90. Al no existir virus estrechamente relacionados, la mayoría de las secuencias se agruparon en un clúster único, con gran divergencia de aquellos más similares. Este clúster monofilético sugiere una introducción única; por lo tanto, el segmento N2 habría evolucionado independientemente en nuestro país. Estos virus tampoco estarían relacionados con los virus reportados por Vincent *et al.*, 2009 descritos como virus humanos encontrados en porcinos asociados a los subtipos H3N2 porcino o al H1N2 (H1 clúster δ I y II.)

Si bien las secuencias más cercanas fueron obtenidas en otros países, es posible pensar que virus similares a estos estuvieron presentes en la población humana en Chile posiblemente en los años 90 y debido a la escasa secuenciación viral, no está evidenciada hoy en día para realizar análisis.

Los virus subtipificados como H3N2 correspondieron a introducciones únicas que no estuvieron relacionadas con el clúster N2 chileno y tampoco presentaron mayor relación con secuencias de otros países. Los *singleton* de N2 provendrían de dos introducciones distintas y su distribución en el árbol sugiere que no se han diseminado de forma eficiente en la población porcina.

Según Sandbulte *et al*, 2015, los genes que codifican para el segmento N2 se dividen en dos linajes diferentes, correspondientes al N2 de 1998 y el N2 de 2002. El primero fue introducido desde el H3N2 humano estacional que circuló alrededor del año 1990 y el segundo fue introducido desde un virus similar que circuló entre 2001-2002. Según el estudio realizado en BLAST, los virus presentes en Chile para N2 son más similares al

linaje de los 90's, e incluso dentro del árbol filogenético el clúster chileno N2 se aleja de aquellos N2 humanos cercanos al 2002, lo cual confirma lo anteriormente expuesto.

Una forma de conocer el origen de los virus encontrados en Chile podría ser mediante la realización de un análisis para la obtención del ancestro común más cercano, a través de genética bayesiana; sin embargo, este análisis es de mayor complejidad y requiere conocimiento avanzado en filogenia.

Con respecto a las empresas en estudio, algunas evidenciaron la presencia de una sola variante viral que provenía desde diferentes aislados secuenciados, lo que indicó la circulación de un solo virus en estos lugares. Esto ocurrió en muestras de la Empresa F, analizada para el segmento N1 y en muestras de la Empresa T, analizadas para el segmento N2.

También se observó que la misma variante viral se encontró en distintas empresas. Es el caso de las Empresas G, J y A, las cuales comparten el mismo segmento N2 en los virus que circulan por éstas, correspondientes al subtipo H1N2. Esto podría sugerir que una variante viral de H1N2 determinada se transmitió a estos planteles en la Región Metropolitana, Región de Valparaíso y Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, manteniéndose estable en la población porcina sin evidenciar aún algún tipo de deriva antigénica en estas empresas. Con respecto al N2 proveniente de virus H3N2, ambos virus pertenecientes a este subtipo fueron encontrados en empresas distintas y no poseen relación filogenética entre ellas, por lo que se deduce que son introducciones independientes. Estos virus no fueron capaces de transmitirse al resto de empresas, posiblemente debido a la lejanía entre éstas o a la baja transmisibilidad del virus.

En relación a las granjas en estudio, hay algunas que poseen sólo una variante viral de virus influenza A. Sin embargo, hay otras que poseen 2 variantes virales distintas, evidenciadas por el subtipo o por la distribución que se visualiza en el árbol filogenético, concordando con lo descrito por Corzo *et al*, 2013 acerca de la presencia de múltiples variantes en los planteles porcinos. Esto ocurre en las Empresas A Granja 2, con subtipos H1N1 y H1N2; y la Empresa A Granja 3 que presenta H1N1 y H3N2. Además, esta empresa presenta distintas introducciones del segmento N1 en cada una de sus granjas, por lo que no existiría

transmisión evidente entre ellas. Por otra parte, la Granja G posee virus pertenecientes a subtipos H1N1 y H1N2, pero adicionalmente el análisis filogenético reportó 2 virus diferentes para N1 y 2 para N2. Esta empresa fue la única que presentó este patrón, lo que podría estar relacionado a la presencia de más de una granja dentro del grupo de muestras obtenidas.

En relación a la distancia genética calculada, en general se observó que los N1 pandémicos son más distintos entre ellos que los N2 chilenos entre ellos. Esto se explicaría debido a que los virus N1 provienen de diferentes introducciones del virus pandémico a la población porcina chilena, mientras que los virus agrupados en el clúster N2 chileno provienen de una introducción única, por lo que se espera una menor variabilidad.

Por último, si bien se identificaron los porcentajes de cada uno de los subtipos por región geográfica, estos cálculos no permiten determinar la prevalencia de estos subtipos en las distintas regiones del país. Por lo tanto, se debería seguir investigando al respecto, añadiendo más muestras al estudio por cada región geográfica, para posteriormente realizar un análisis más profundo de los virus encontrados en Chile y determinar así una prevalencia más cercana.

CONCLUSIÓN

El virus influenza A de origen porcino es una enfermedad de gran importancia en Chile. La gran población de cerdos presente en el territorio nacional y la categorización de enfermedad endémica del virus influenza A, constituyen una razón de importancia para realizar estudios de divergencia genética de este virus.

A través de este estudio se logró determinar la variabilidad genética del gen que codifica para la NA en plantales porcinos de producción intensiva en Chile. Se observó la presencia de dos clúster predominantes, el N1 pandémico y el N2 chileno, este último no estando relacionado con otros virus porcinos encontrados en otros países del mundo. Además, se confirmó que no existe presencia de virus clásicos porcinos de Estados Unidos en Chile, por lo que se sugiere que este virus no ha ingresado al territorio nacional a pesar de la importación de animales desde Norteamérica. Por lo tanto, las medidas de bioseguridad y específicamente la cuarentena que se realiza estaría jugando un papel importante en evitar la diseminación del virus.

Se confirma, en primera instancia, la transmisión continua que existe de virus influenza A entre la especie humana y la porcina, debido a la detección de NA humano en la población porcina chilena. Se describe además las distintas maneras en las cuales el virus se presenta en esta especie, pudiendo ingresar a través de introducciones múltiples o de introducciones únicas que divergen a lo largo del tiempo.

Se pudo observar también el comportamiento del virus influenza A en esta población, presentándose distintas variantes simultáneamente en una misma empresa, o también la misma variante viral en distintas empresas y zonas geográficas, lo que demuestra la amplia difusión del virus.

Claramente el número muestral y la cantidad de granjas que se muestrean tienen gran importancia para descartar la presencia de otras variantes virales y por lo tanto, se requieren mayores estudios para lograr un conocimiento más amplio acerca del virus influenza A.

El segmento que codifica para la NA puede poseer cierta variabilidad en zonas específicas de importancia inmunológica, por lo cual esta memoria de título abre paso a nuevos

estudios que permitan determinar más a fondo los cambios que ocurren en esta glicoproteína. De esta manera se ampliará el conocimiento de la divergencia genética del virus influenza A de origen porcino en Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALI, A.; KHATRI, M.; WANG, L.; SAIF, Y.; LEE, C.** 2012. Identification of swine H1N2/pandemic H1N1 reassortant influenza virus in pigs, United States. *Vet. Microbiol.* 158:60-68.
- **CAPPUCCIO, J.; DIBÁRBORA, M.; RIMONDI, A.; PIÑEYRO, P.; INSARRALDE, L.; QUIROGA, M.; MACHUCA, M.; CRAIG, M.; OLIVERA, V.; CHOCKALINGAM, A.; PERFUMO, C.; PEREZ, D.; PEREDA, A.** 2011. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *J Gen Virol.* 12:2871-2878.
- **CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2015. Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine. [En línea] <<http://www.cdc.gov/flu/about/season/vaccine-selection.htm>> [Consulta: 20-08-2015].
- **CORZO, C.; CULHANE, M.; JULEEN, K.; STIGGER-ROSSER, E.; DUCATEZ, M.; WEBBY, J.; LOWE, J.** 2013. Active Surveillance for Influenza A Virus among Swine, Midwestern United States, 2009–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19(6):954-960.
- **COX, N.; FULLER, F.; KAVERIN, N.; KLENK, H.; LAMB, R.; MAHY, B.; MCCAULEY, J.; NAKAMURA, K.; PALESE, P.; WEBSTER, R.** 2000. Orthomyxoviridae. **In:** Regenmortel, M.; Fauquet, C.; Bishop, D.; Carstens, E.; Estes, M.; Lemon, S.; Maniloff, J.; Mayo, M.; McGeoch, D.; Pringle, C.; Wickner, R. *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, California. Pp: 585-597.
- **DIBÁRBORA, M.; CAPPUCCIO, J.; OLIVERA, V.; QUIROGA, M.; MACHUCA, M.; PERFUMO, C.; PEREZ, D.; PEREDA, A.** 2013. Swine influenza: clinical, serological, pathological and virological cross-sectional studies in nine farms in Argentina. *Influenza Other Respir Viruses.* 4:10-15.
- **DLUGOLENSKI, D.; JONES, L.; HOWERTH, E.; WENTWORTH, D.; TOMPKINS, S.; TRIPP, R.** 2015. Swine Influenza Virus PA and Neuraminidase Gene Reassortment into Human H1N1 Influenza Virus Is Associated with an Altered Pathogenic Phenotype Linked to Increased MIP-2 Expression. *J. Virol.* May. 89(10): 5651-5667.
- **ESPINOLA, E.** 2012. Genome Stability of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Based on Analysis of Hemagglutinin and Neuraminidase Genes. *Open Virol J.* 6: 59–63.
- **FASCE, R.; TOGNARELLI, J.; MORA, J.; TORRES, G.; ANDRADE, W.; BUSTOS, P.; ARAYA, P.; BALANDA, M.; AGUAYO, C.; SEIN, J.; RAMIREZ, E.; FERNANDEZ, J.** 2011. Inicio del brote de influenza A (H1N1) pandémica en Chile: caracterización genética de los primeros casos detectados. *Rev Med Chile.* 139 (7): 833-840.

- **FENNER, R.; MAURIN, J.** 1976. The classification and nomenclature of viruses. *Arch Virol.* 51(1): 141-149.
- **FREIDL, G. MEIJER, A.; DE BRUIN, A.; DE NARDI, M.; MUÑOZ, O.; CAPUA, I.; BREED, A.; HARRIS, K.; HILL, A.; KOSMINDER, R.; BANKS, J.; VON DOBSCHUETZ, S.; STARK, K.; WIELAND, B.; STEVENS, K.; VAN DER WERF, S.; ENOUF, V.; VAN DER MEULEN, K.; VAN REETH, K.; DAUPHIN, G.** 2014. Influenza at the animal–human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A (H5N1). *Euro. Surveill.* 19(18): 1-19.
- **HALBHERR, S.; LUDERSDORFER, T.; RICKLIN, M.; LOCHER, S.; BERGER RENTSCH, M.; SUMMERFIELD, A.; ZIMMER, G.** 2014. Biological and Protective Properties of Immune Sera Directed to the Influenza Virus Neuraminidase. *J Virol.* 89(3): 1550–1563.
- **HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T.** 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 22(2): 160-174.
- **HAUSE, B.; OLESON, T.; STINE, D.; BEY R.; SIMONSON, R.** 2011. Genetic and antigenic characterization of recent human-like H1 (δ -cluster) swine influenza virus isolates. *J Swine Health Prod.* 19 (5): 268–276.
- **HU, W.** 2015. Computational Study of Interdependence Between Hemagglutinin and Neuraminidase of Pandemic 2009 H1N1. *IEEE Trans. Nanobiosci.* 14(2): 157-166.
- **INTERNATIONAL COMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, ICTV.** 2014. Virus Taxonomy: 2014 Release. [En línea] <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>> [Consulta: 03-03-2016]
- **KOMADINA, N.; MCVERNON, J.; HALL, R.; LEDER, K.** 2014. A historical perspective of influenza A(H1N2) virus. *Emerg Infect Dis.* 20(1): 6-12.
- **NELSON, M.; CULHANE, M.; ROVIRA, A.; TORREMORELL, M.; GUERRERO, P.; NORAMBUENA, J.** 2015a. Novel Human-like Influenza A Viruses Circulate in Swine in Mexico and Chile. *PLoS. Curr.* Edición 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.c8b3207c9bad98474eca3013fa933ca6.
- **NELSON, M.; SCHAEFER, R.; GAVA, D.; EGIDIO, M.; REIS, J.** 2015b. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21(8): 1339-1347.
- **NELSON, M.; STRATTON, J.; KILLIAN, M.; JANAS-MARTINDALE, A.; VINCENT, A.** 2015c. Continual reintroduction of human pandemic H1N1 influenza A viruses into swine in the United States, 2009 to 2014. *J Virol.* 89(12): 6218-6226.

- **PEREDA, A.; CAPPuccio, J.; QUIROGA, M.; BAUMEISTER, E.; INSARRALDE, L.; IBAR, M.; SANGUINETTI, R.; CANNILLA, M.; FRANZESE, D.; ESCOBAR CABRERA, O.; CRAIG, M.; RIMONDI, A.; MACHUCA, M.; DEBENEDETTI, R.; ZENOBI, C.; BARRAL, L.; BALZANO, R.; CAPALBO, S.; RISSO, A.; PERFUMO, C.** 2010. Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 16(2): 311-313.
- **PEREDA, A.; RIMONDI, A.; CAPPuccio, J.; SANGUINETTI, R.; ANGEL, M.; YE, J.; SUTTON, T.; DIBÁRBORA, M.; OLIVERA, V.; CRAIG, M.; QUIROGA, M.; MACHUCA, M.; FERRERO, A.; PERFUMO, C.; PEREZ, D.** 2011. Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza Other Respir Viruses.* 5(6): 409-412.
- **RUTVISUTTINUNT, W.; CHINNAWIROTPISAN, P.; SIMASATHIEN, S.; SHRESTHA, S.; YOON, I.; KLUNGTHONG, C.; FERNANDEZ, S.** 2013. Simultaneous and complete genome sequencing of Influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. *J. Virol. Methods.* 193(2): 394-404.
- **SANDBULTE, M.; SPLICKER, A.; ZAABEL, P.; ROTH, J.** 2015. Optimal use of vaccines for control of influenza A virus in swine. *Vaccines.* 3:22-73.
- **SCHMIDT, C.; CIBULSKI, S.; MUTERLE, A.; MENGUE, C.; WENDLANT, A.; QUOOS, F.; LOPES DE ALMEIDA, L.; FRANCO, A.; ROEHE, P.** 2014. Full-genome sequence of a reassortant H1N2 influenza A virus isolated from pigs in Brazil. *Genome Announc.* 2(6): e01319-14.
- **SHRAUWEN, E.; FOUCHIER, R.** 2014. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerg. Microbes. Infect.* 2014 Feb; 3(2): e9.
- **URBANIAK, K.; MARKOWSKA-DANIEL, I.** 2014. *In vivo* reassortment of Influenza viruses. *Acta Biochim Pol.*61(3):427-431.
- **URBANIAK, K.; KOWALCZYK, A.; MARKOWSKA-DANIEL, I.** 2014. Influenza A viruses of avian origin circulating in pigs and other mammals. *Acta Biochim Pol.*61(3):433-439.
- **VINCENT, A.; MA, W.; LAGER, K.; GRAMER, M.; RICHT, J.; JANKE, B.** 2009. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes.* 39(2):176-85.
- **VINCENT, A.; AWADA, L.; BROWN, I.; CHEN, H.; CLAES, F.; DAUPHIN, G.; DONIS, R.; CULHANE, M.; HAMILTON, K.; LEWIS, N.; MUMFORD, E.; NGUYEN, T.; PARCHARIYANON, S.; PASICK, J.; PAVADE, G.; PEREDA, A.; PEIRIS, M.; SAITO, T.; SWENSON, S.; VAN REETH, K.; WEBBY, R.; WONG, F.; CIACCI-ZANELLA, J.** 2014. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses. Public. Health.* 61(1): 4-17.

- **WEBBY, R.; SWENSON, S.; KRAUSS, S.; GERRISH, P.; GOYAL, S.; WEBSTER, R.** 2000. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol.* 74(18): 8243-8251.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO).** 2009. CDC protocol of real time RT-PCR for influenza A (H1N1). [En línea]. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf> [Consulta: 18-08-2015].

- **ZHOU, B.; DONNELLY, M.; SCHOLER, D.; ST.GEORGE, K.; HATTA, M.; KAWAOKA, Y.; WENTWORTH, D.** 2009. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J.Virol.* 83:10309-10313.

- **ZVELEBIL, M.; BAUM, J.** 2008. Understanding bioinformatics. Garland Science, Taylor & Francis Group. Nueva York, USA. 772 p.