



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

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS GENES
PB2, PB1 Y PA DEL COMPLEJO POLIMERASA DEL VIRUS
INFLUENZA TIPO A DE ORIGEN PORCINO EN CHILE**

Gabriel Ignacio Sepúlveda Valenzuela

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

PROFESOR GUÍA: VICTOR NEIRA RAMÍREZ
Universidad de Chile
Financiamiento Proyecto: FONDECYT 11170877 y ANILLO ACT 1408

SANTIAGO, CHILE
2018



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

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS GENES
PB2, PB1 Y PA DEL COMPLEJO POLIMERASA DEL VIRUS
INFLUENZA TIPO A DE ORIGEN PORCINO EN CHILE**

Gabriel Ignacio Sepúlveda Valenzuela

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

Nota Final

Prof. Guía: Víctor Neira Ramírez

Profesor Corrector: José Pizarro Lucero

Profesor Corrector: Carlos Navarro Venegas

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a quienes me ayudaron en la realización de esta memoria de título,

Al Dr. Víctor Neira Ramírez, por su inmensa paciencia, por su confianza, por su gran disposición y por compartir conmigo tanto su tiempo como sus conocimientos.

Al Dr. José Pizarro y al Dr. Carlos Navarro, quienes me ayudaron y guiaron en la realización de esa memoria mediante sus correcciones y consejos.

A todos quienes formaron parte del Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile durante este proceso, por la buena disposición al compartir parte de su trabajo y sus conocimientos.

A mi familia, sobre todo a mis padres, quienes se han sacrificado inmensamente por mí y siempre me han brindado su apoyo y confianza.

A mis amigas y amigos, que me ayudaron tanto técnica como moralmente todo este tiempo.

A mi pareja, Bernardita Quezada, por su incondicional apoyo, su infinita paciencia y por contenerme emocionalmente durante todo este proceso.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
Aspectos Generales.....	2
Etiología.....	2
Polimerasa Básica 2.....	4
Polimerasa Básica 1.....	4
Polimerasa Ácida.....	5
Contexto mundial.....	7
Contexto nacional.....	7
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. Obtención y procesamiento de muestras.....	9
2. Diagnóstico y aislamiento viral.....	9
2.1.RT-PCR en tiempo real.....	9
2.2- Aislamiento viral.....	9
3. Secuenciación.....	10
4. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	11
RESULTADOS.....	13
Caso 1.....	18

Caso 2	19
Caso 3	20
Caso 4	21
Caso 5	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS.....	32
Anexo 1- Proceso de transcripción mediado por <i>cap-snatching</i>	32
Anexo 2- Número de muestras según plantel y región geográfica.	33
Anexo 3- Virus, plantel al que pertenecen y clúster según tipo de secuencia.	34
Anexo 4- Virus cuyas secuencias no coincidieron en el mismo clúster de cada árbol, según plantel y tipo de secuencia.	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1- Número de secuencias obtenidas y ubicación geográfica de cada plantel.....	11
Tabla N° 2- Clústeres en colores y número de secuencias pertenecientes según tipo.....	17
Tabla N° 3- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.	18
Tabla N° 4- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.	20
Tabla N° 5- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.	21
Tabla N° 6- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.	22
Tabla N° 7- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1- Esquema del genoma viral de FLUAV.	3
Figura N° 2- Modelo del complejo heterotrimérico polimerasa de FLUAV	4
Figura N° 3- Detalle de las proteínas generadas desde los segmentos 1, 2 y 3, ligados al complejo polimerasa.	6
Figura N° 4- Efecto citopático en aislado viral.	10
Figura N° 5- Árbol filogenético del gen PB2.	14
Figura N° 6- Árbol filogenético del gen PB1.	15
Figura N° 7- Árbol filogenético del gen PA.	16
Figura N° 8- Esquema de FLUAV dentro de un plantel.	19
Figura N° 9- Esquema hipotético de la introducción de genes desde los planteles 11 y 18 hacia el plantel 9.	20
Figura N° 10- Esquema hipotético de la transmisión de virus mediante trabajadores de distintos planteles que comparten un espacio común.	21
Figura N° 11- Esquema hipotético del reordenamiento genético de un virus de genes conocidos con otro de origen desconocido.	22

RESUMEN

El virus influenza A (FLUAV) ha sido ampliamente estudiado debido a su gran importancia en salud pública y animal. Una de las razones de esto es su gran variabilidad genética otorgada en gran medida por el proceso de *reassortment* o reordenamiento genético. Este estudio consistió en la determinación de la diversidad genética de los genes que componen el complejo polimerasa del virus, es decir, los genes que codifican para la polimerasa básica 2 (PB2), la polimerasa básica 1 (PB1) y la polimerasa ácida (PA) de virus aislados de plantales porcinos de producción intensiva en Chile y evidenciar procesos de reordenamientos genéticos independientes de dichos genes. Para esto, se analizaron 2824 muestras desde 33 plantales porcinos mediante diagnóstico viral por RT-PCR en tiempo real, aislamiento viral, amplificación de segmentos virales por RT-PCR multisegmento y secuenciación por Illumina. Se obtuvieron un total de 89 secuencias genómicas de PB2 y 92 tanto de PB1 como de PA. Luego se realizó un análisis filogenético con estas secuencias nucleotídicas, más secuencias de referencia mediante el método Maximum likelihood. Todas las secuencias para los tres genes estudiados pertenecen al linaje pandémico del 2009. Se constató además la presencia de reordenamientos de estos genes en aproximadamente un 35% de los casos. Estos resultados permitieron conocer sobre la diversidad genética de los genes que componen el complejo polimerasa de FLUAV en Chile y pesquisar fenómenos de reordenamientos de estos. Además, permitieron evidenciar posibles quiebres de bioseguridad en parte de las producciones porcinas intensivas en Chile, debido a las relaciones filogenéticas encontradas entre virus de diferentes plantales. Futuros estudios son necesarios para confirmar y entender estos hallazgos.

Palabras clave: Influenza, complejo polimerasa, diversidad genética, reordenamiento genético, porcino.

ABSTRACT

The influenza A virus (FLUAV) has been extensively studied for the importance in public and animal health. The virus presented high genetic diversity, due to in part, by the reassortment events. The aim of this study it was to determinate the genetic diversity of the segments 1 (PB2), 2 (PB1) and 3 (PA) of FLUAV isolated from swine in intensive production farms in Chile and too evidence reassortment events in these genes. For this, 2824 samples were collected from 33 pig farms. Real time RT-PCR, viral isolation, and full genome sequencing were performed. A total of 89 genomic sequences of PB2 and 92 genomic sequences for PB1 and PA were obtained. Using phylogeny, we determinate that all segment belonged into the pandemic 09 cluster. The results suggest reassortment events of these genes in approximately 35% of the cases. This is the first study about the genetic diversity of the PB2, PB1 and PA, internal genes and to evidence reassortment events of them in swine population. In addition, the phylogeny suggests direct or indirect transmission between farms. Further studies are needed to better understand the viral dynamic of polymerase genes.

Key words: Influenza, polymerase genes, genetic diversity, reassortment, pig.

INTRODUCCIÓN

Influenza A (FLUAV, por sus siglas en inglés) es uno de los patógenos más importantes en salud pública y animal. El cerdo ha sido históricamente afectado por este. En los años 30 se aísla el virus desde cerdos, el cual correspondía al virus de la gripe española de 1918, evidenciando la transmisión de humano a cerdo. Recientemente, en 2009, la última pandemia de influenza A fue causada por la aparición de un virus de origen porcino, el llamado H1N1pandémico del 2009, reforzando el interés de la salud pública por investigar los virus de influenza de origen porcino.

Por otro lado, FLUAV representa una enfermedad con un alto impacto productivo y sanitario en el cerdo. Puede provocar tormentas de abortos en hembras gestantes producto de la fiebre y, por otro lado, causar un cuadro respiratorio caracterizado por tos, estornudos, anorexia y decaimiento. En el cerdo, FLUAV es uno de los patógenos primarios del complejo respiratorio del cerdo (PRDC, por sus siglas en inglés) causando un daño respiratorio inicial que luego se agrava con la presencia de patógenos secundarios.

FLUAV, tiene un genoma segmentado, lo que facilita el reordenamiento del virus, es decir, si una célula es infectada por dos o más virus, los segmentos pueden reorganizarse y generar una nueva variante. Entre los segmentos genéticos, los más estudiados son los que codifican para las proteínas de superficie, es decir, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), las cuales son inmunogénicamente importantes y en las que se ha observado en innumerables ocasiones el reordenamiento genético, generando nuevas variantes virales. Por otro lado, existen proteínas importantes para la replicación viral. Estas son las que conforman el complejo polimerasa que corresponde a una proteína heterotrimérica, que incluye la subunidad polimerasa básica 2 (PB2) subunidad polimerasa básica 1 (PB1) y subunidad polimerasa ácida (PA). La filogenia de los genes que codifican estas proteínas ha sido poco estudiada y aún menos la interacción entre éstas y su reordenamiento. Considerando que estas proteínas realizan una función conjunta es posible que los eventos de reordenamiento de los genes que codifican para estas no sean independientes entre sí. Este estudio tiene como objetivo el análisis filogenético de PB2, PB1 y PA de FLUAV de origen porcino en Chile y evidenciar eventos de reordenamiento de estos genes.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aspectos Generales

El virus influenza tipo A (FLUAV, por su denominación actual en inglés) es uno de los patógenos más importantes desde el punto de vista clínico y epidemiológico, pues ha tenido responsabilidad en varias epidemias humanas y animales. FLUAV infecta a mamíferos y a aves, siendo las aves acuáticas de los órdenes *Anseriformes* y *Charadriiformes*, como patos silvestres, gansos, cisnes, gaviotas y otras aves costeras; el reservorio natural del virus (Zell *et al.*, 2012). Es altamente contagioso y se transmite por aerosoles causando patologías respiratorias, las cuales pueden provocar una neumonía severa y por último la muerte del animal infectado. La enfermedad afecta a todos los grupos etarios y puede ocurrir en más de una ocasión (Pleschka, 2012).

En el caso del cerdo, FLUAV es un patógeno endémico de las explotaciones porcinas intensivas. Los FLUAV de origen porcino tienen potencial zoonótico y pueden infectar a los humanos (Pleschka, 2012). Sin embargo, es más común que los virus humanos sean introducidos a las poblaciones de cerdos, concepto conocido como zoonosis reversa o simplemente zoonosis. El porcino entonces tendría un rol de reservorio de FLUAV, lo cual ha sido evidenciado en la última pandemia, la Influenza H1N1pandémica del 2009, la cual fue causada por un virus de origen porcino (García, 2016; Pleschka, 2012).

Etiología

Los virus influenza, pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Son virus RNA de hebra simple segmentada con polaridad negativa. Existen 4 géneros de Influenza; *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* y *Influenzavirus D*, esto según diferencias genéticas y antigénicas (Murakami *et al.*, 2016; Pleschka, 2012).

El FLUAV posee un RNA dividido en 8 segmentos de RNA monocatenario de polaridad negativa. En total el virus codifica entre 11 a 12 proteínas (Figura N° 1). Cada segmento codifica para distintas proteínas. Los segmentos principales son: el segmento 1 que codifica para la polimerasa básica 2 (PB2), el segmento 2 que codifica para la polimerasa básica 1 (PB1), el segmento 3 que codifica para la polimerasa ácida (PA), el segmento 4 que codifica

para la hemaglutinina (HA), el segmento 5 que codifica para la nucleoproteína (NP), el segmento 6 que codifica para la neuraminidasa (NA), el segmento 7 que codifica para proteínas de matriz (M) y el 8 segmento que codifica para las proteínas no estructurales (NS) (Plant y Ye, 2013; Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014).

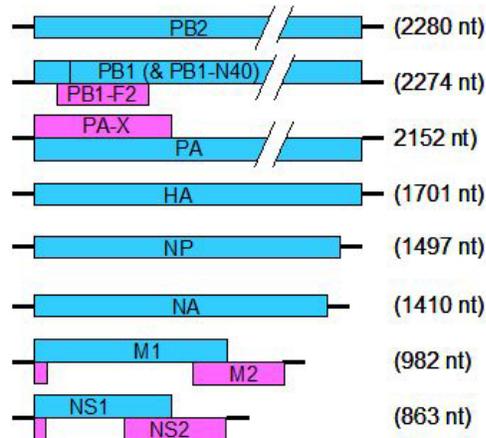


Figura N° 1- Esquema del genoma viral de FLUAV. Rectángulos azules y lilas representan proteínas codificadas (Adaptado de Plant y Ye, 2013).

La subclasificación de FLUAV está dada por la diversidad genética y antigénica de las dos glicoproteínas de superficie que posee, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), habiéndose descrito a la fecha 18 tipos de HA y 11 tipos de NA (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014).

Los viriones de FLUAV están constituidos por una envoltura viral compuesta de una capa bilipídica, parte de la membrana celular de la célula hospedera, que tiene insertas HAs, NAs y proteínas de matriz, que le dan soporte a la estructura. En el interior, el virión contiene 8 complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) y cada uno contiene un complejo de polimerasa junto a varias NPs (Pleschka, 2012).

La replicación y transcripción viral es realizada por el complejo polimerasa, que corresponde a una RNA polimerasa dependiente de RNA, unidad heterotrimérica constituida por la polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa básica 1 (PB1) y polimerasa ácida (PA) (Figura N° 2), siendo la primera la de mayor importancia para la virulencia, el rango de hospederos y la adaptación a nuevos hospederos por parte del virus. (Boivin *et al.*, 2010).

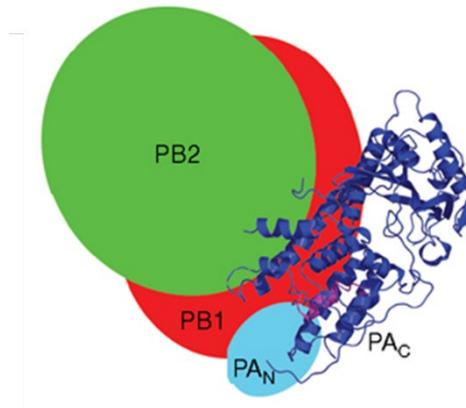


Figura N° 2- Modelo del complejo heterotrimérico polimerasa de FLUAV (Adaptado de He *et al.*, 2008).

Polimerasa Básica 2

El segmento 1 tiene un tamaño de 2280 nucleótidos (nt) e históricamente se reconoce que codifica para la polimerasa básica 2 (PB2); sin embargo, recientemente se ha demostrado que además codifica para una proteína denominada PB2-S1 de la cual aún no se conoce su función, aunque es común en cepas H1N1pandémicas del 2009 y H3N2 (Yamayoshi *et al.*, 2016).

La proteína PB2 juega un rol esencial en la iniciación de la transcripción a través de un mecanismo denominado *cap-snatching* o *cap-stealing*, en el cual un RNA mensajero es captado por la PB2 y cortado por la PA, obteniendo así un segmento de entre 10 y 20 nt, el cual es usado como partidor para la transcripción viral (Boivin *et al.*, 2010) (Anexo 1). También juega un rol fundamental en la replicación viral y modula la actividad del complejo de RNPs. Adicionalmente, inhibe la producción de Interferón tipo I al interactuar con las proteínas de señalización antiviral mitocondrial (MAVS, por sus siglas en inglés) (Patel *et al.*, 2012).

Polimerasa Básica 1

El segmento 2 tiene un tamaño de 2274 nt y codifica para 3 diferentes proteínas, siendo la principal la polimerasa básica 1 (PB1). La PB1 corresponde a la subunidad catalizadora del

complejo RNA polimerasa dependiente de RNA de FLUAV, es decir, se encarga de adicionar nucleótidos a los transcritos de RNA. Esta polimerasa no tiene actividad correctora (*proofreading*), lo que resulta en una alta tasa de mutación de genes de aproximadamente 1 error por replica de genoma, por lo tanto, cada célula infectada puede llegar a producir 10 mil nuevos mutantes que pueden infectar a otra célula. Lo anterior es de suma importancia en la estrategia evolutiva del virus. Por ejemplo, los continuos cambios en las glicoproteínas de superficie permiten la evasión de la respuesta inmune del hospedero, lo que se llama cambio antigénico (*antigenic drift*), lo cual permite el escape de los virus estacionales de FLUAV a las vacunas (Boivin *et al.*, 2010). El gen PB1, además, produce un péptido de 87 aa denominado PB1-F2 el cual se produce a través de la lectura alternativa del gen, y se ha demostrado que tiene una actividad apoptótica celular, es decir, incrementa la virulencia de algunas cepas (Figura N° 3). Además, a dicha proteína se le atribuye la capacidad de promover la inflamación y de regular la actividad de la polimerasa viral por su interacción con la subunidad PB1 (Pleschka, 2012). Finalmente, se ha reportado otra proteína conocida como PB1-N40, que corresponde a una proteína PB1 truncada, que comienza en el codón 40. La PB1-N40, al parecer regula la replicación viral y los mutantes que no la producen son igualmente infecciosos, aunque su replicación es mucho más lenta (Wise *et al.*, 2009).

Polimerasa Ácida

El segmento 3 tiene un tamaño de 2152 nt y produce principalmente la polimerasa ácida y otras proteínas descubiertas con posterioridad. La polimerasa ácida o PA tiene actividad RNA y DNA endonucleasa y es parte fundamental del complejo polimerasa. Su actividad ha sido recientemente descubierta, la cual corresponde al corte de los segmentos de RNA del hospedero captados mediante el método *cap-snatching* previamente mencionado (Dias *et al.*, 2009). Otra proteína descrita para el gen es la PA-X, esta corresponde a la fusión de los primeros 191 aa de la proteína PA normal, más un péptido de 61 aa resultantes de un cambio de lectura +1 del gen (*frameshifting*). Esto resulta en una proteína que disminuye la expresión de proteínas de la célula hospedero y se sugiere que tendría actividad endonucleasa degradando RNA mensajero del hospedero. Se ha descrito, además, que la proteína PA-X disminuye el daño viral al hospedero reduciendo la expresión de determinadas citoquinas proinflamatorias, a diferencia de la PB1-F2 por lo que se presume que ambas proteínas

trabajan en conjunto para modular óptimamente la inmunidad del hospedero (Pleschka, 2012; Yewdell e Ince, 2012). Finalmente, PA también produce 2 proteínas truncadas llamadas PA-N155 y PA-N182, generadas por un inicio de lectura posterior al igual que la PB1-40 (Figura N° 3) (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014).

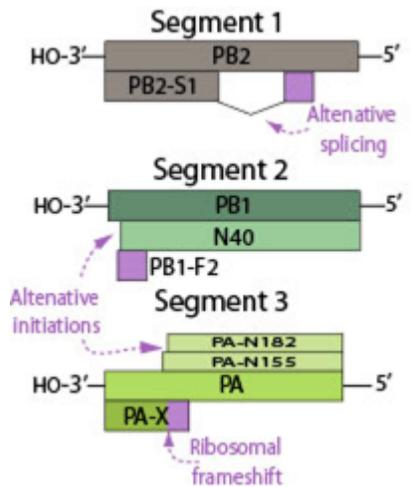


Figura N° 3- Detalle de las proteínas generadas desde los segmentos 1, 2 y 3, ligados al complejo polimerasa (ViralZone, 2017).

La interacción entre las diferentes polimerasas es esencial para una óptima replicación. Lo mismo ocurre con los diferentes segmentos. Ya que el RNA de FLUAV es segmentado, dos o más virus pueden intercambiar segmentos de RNA cuando estos se encuentran infectando una misma célula. Este fenómeno de reordenamiento genético o *reassortment*, además de permitir la transmisión del virus entre distintas especies, permite la generación de virus para los cuales la población podría no poseer inmunidad (Dlugolenski *et al.*, 2015).

Durante la transcripción y la replicación, cada RNP funciona como una unidad funcional independiente lo que aumenta la probabilidad de reordenamiento genético (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014). Cuando el reordenamiento ocurre en sólo un segmento, podría considerarse independiente, sin embargo, es usual que ocurra en varios al mismo tiempo, lo que ya se ha reportado de manera preliminar en Chile (Tapia *et al.*, 2018).

Este fenómeno de reordenamiento genético ocurre comúnmente en la especie porcina, debido que las células epiteliales traqueales del cerdo se expresan receptores que permiten la infección con cepas aviarias y humanas (Urbaniak y Markowska-Daniel, 2014).

Contexto mundial

A lo largo de la historia moderna, específicamente desde principios del siglo XX, se han identificado 4 pandemias importantes, 3 de ellas como resultado de reordenamientos (Dlugolenski *et al.*, 2015). El cerdo es considerado un reservorio de virus humanos por lo cual debe ser estudiado. En todo el mundo se ha reportado FLUAV en porcinos lo cual genera gran interés, sobre todo después de la gripe pandémica del 2009. El virus pandémico H1N1 hoy es el más prevalente en la población humana mundial y también se ha vuelto muy común en los cerdos, incluso en Chile para ambas especies (Comunicación personal Rafael Medina PUC; Tapia *et al.*, 2016).

Respecto a la diversidad genética de los segmentos 1, 2 y 3 existen pocos estudios que aborden el tema en profundidad, uno de estos es el de Soltanialvar *et al.* (2012), en el cual se concluyó que los virus H9N2 en Irán mostraban una gran redistribución de estos segmentos, sobre todo del segmento 2, lo que llevó a la generación de nuevos genotipos.

Contexto nacional

El FLUAV ha sido estudiado consistentemente desde el 2012, y se conoce que existen diferentes variantes del virus (H1N1, H1N2 y H3N2) en la mayoría de los planteles porcinos nacionales (Tapia *et al.*, 2016). Si bien se ha estudiado en profundidad la variabilidad genética de los genes que codifican proteínas inmunogénicas, no existe un estudio acabado de otros segmentos virales que están relacionados con la replicación viral, ni tampoco la interacción que en ellos existe.

HIPÓTESIS

Debido a que las proteínas PB2, PB1 y PA forman un complejo y actúan en conjunto, los genes que codifican para estas proteínas han coevolucionado, formando un *cassette* genético. Por lo tanto, no se observarán reordenamientos independientes de estos genes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad genética de los genes PB2, PB1 y PA de virus porcinos chilenos aislados entre los años 2012 y 2016, y determinar si existen reordenamientos independientes de estos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la diversidad genética de PB2, PB1 y PA de virus porcinos chilenos aislados entre los años 2012 y 2016.
2. Determinar si existen reordenamientos independientes de los genes PB2, PB1 y PA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y procesamiento de muestras

Se utilizaron muestras obtenidas entre 2012 y 2016. En total se incluyó a todos los productores de cerdos intensivos del país, es decir, prácticamente al 100% de la producción intensiva de cerdos de Chile, correspondiendo estos a 28 empresas, distribuidas en 33 planteles. El muestreo fue realizado usando el protocolo estándar descrito previamente por el equipo de trabajo (Arce, 2015; García, 2016).

Se obtuvo un total de 2824 muestras provenientes de distintas regiones del país, detalladas en el Anexo 2.

2. Diagnóstico y aislamiento viral

RT-PCR en tiempo real

El RNA se usó para la detección del virus a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real usando transcriptasa reversa (RT-rtPCR) (WHO, 2009). Este protocolo ha sido validado anualmente respecto a su eficiencia usando test de pro-eficiencia por el Center for Research on Influenza Pathogenesis (CRIP) National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

Los resultados del RT-rtPCR son expresados en Ct (cycle threshold) determinados para cada muestra. Estos corresponden al número de ciclos requeridos para identificar una muestra como positiva. De acuerdo con las pruebas de pro-eficiencia las muestras con un Ct < a 35 fueron consideradas positivas.

Aislamiento viral

Una selección de muestras fue usada para aislamiento viral. Se utilizó el protocolo de rutina del laboratorio usando células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) (Arce, 2015; García, 2016). Monocapas de MDCK fueron inoculadas con la muestra y posteriormente incubadas. Las monocapas fueron observadas diariamente por 3 días en busca de efecto citopático (Figura N° 4). Posteriormente, los aislados fueron confirmados por RT-rtPCR nuevamente.

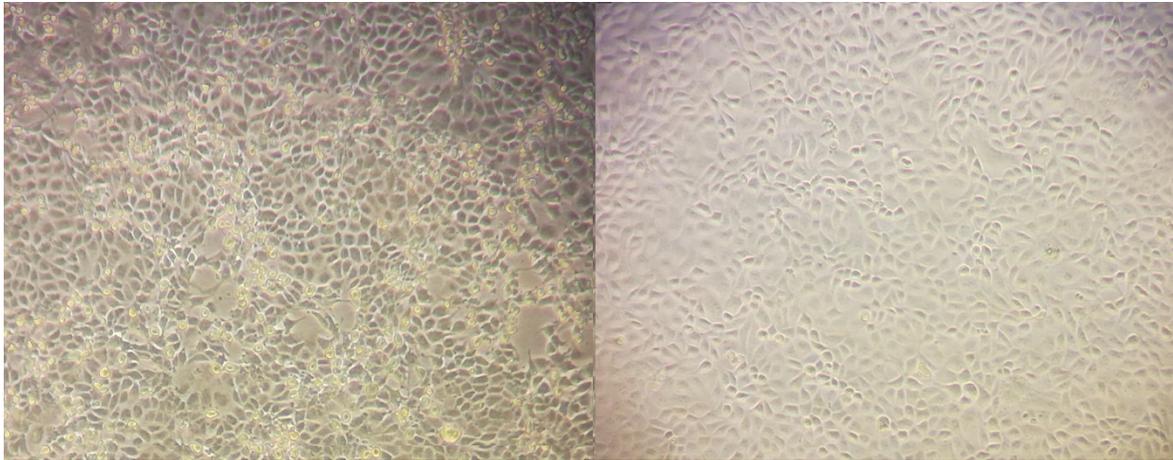


Figura N° 4- Efecto citopático en aislado viral. A la izquierda, efecto citopático en células Madin-Darby Canine Kidney. A la derecha células Madin-Darby Canine Kidney sin infectar.

3. Secuenciación

Los aislados de FLUAV fueron amplificados usando un RT-PCR de multisegmento, que permite amplificar todos los segmentos completos del virus (Zhou *et al.*, 2009). Luego de realizar la electroforesis para confirmar la presencia de los segmentos virales nítidos, el producto de PCR se purificó. Finalmente, se midió la concentración del purificado usando Nanodrop, si este contenía mayor a 25 ng/ μ L se consideraba óptimo para la secuenciación.

Los productos de PCR purificados fueron enviados al CRIP en Mount Sinai School of Medicine, en Nueva York para su secuenciación a través de Illumina (Rutvisuttinunt, 2013). Al cabo de 2 semanas se obtuvieron los archivos FASTA que contenían la información genética de los virus. Para el desarrollo de esta memoria solo se utilizaron los segmentos 1, 2 y 3, aunque si se utilizó la información relacionada al subtipo viral.

Cabe mencionar que los procesos de diagnóstico, aislamiento viral y secuenciación, descritos anteriormente, fueron realizados previamente en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y fueron incluidos en este trabajo para una mejor comprensión.

Finalmente, se obtuvieron 89 secuencias del segmento 1 (PB2) y 92 secuencias de los segmentos 2 y 3 (PB1 y PA respectivamente) (Tabla N° 1). Estas secuencias correspondieron a cepas de los subtipos H1N1 pandémico, H3N2 y H1N2 (García, 2017).

Tabla N° 1- Número de secuencias obtenidas y ubicación geográfica de cada plantel.

Plantel	Región	PB2	PB1	PA
1	Región de O'Higgins	27	29	29
2	Región del Maule	1	1	1
3	Región Metropolitana	9	10	10
4	Región de Valparaíso	2	2	2
5	Región de O'Higgins	3	3	3
6	Región Metropolitana	3	3	3
7	Región Metropolitana	4	4	4
8	Región Metropolitana	10	10	10
9	Región Metropolitana	3	3	3
11	Región Metropolitana	1	1	1
12	Región de O'Higgins	6	6	6
14	Región del Maule	3	3	3
16	Región del Bío-Bío	2	2	2
18	Región Metropolitana	1	1	1
20	Región Metropolitana	1	1	1
21	Región del Bío-Bío	2	2	2
25	Región del Maule	3	3	3
27	Región de O'Higgins	6	6	6
28	Región del Maule	1	1	1
33	Región Metropolitana	1	1	1
Total		89	92	92

4. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias de cada gen fueron alineadas entre sí utilizando el software MEGA (v7.0) (Kumar *et al.*, 2016), luego se realizó un análisis preliminar usando Neighbor-Joining (Backlund, 2010). Se definieron clústeres según la topología de cada árbol, y de cada uno de ellos, se seleccionó una secuencia que fue evaluada con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - NCBI – NIH).

Luego se incorporaron secuencias de referencia para los diferentes genes usando Genbank, Influenza Research Database y GISAID EpiFlu (Global Initiative on Sharing All Influenza Data). Estas resultaron ser de los virus A/California/07/2009(H1N1), A/Hong Kong/1073/99(H9N2), A/Shanghai/02/2013(H7N9), A/Puerto Rico/8/1934(H1N1), A/Korea/426/1968(H2N2), A/New York/392/2004(H3N2) y

A/goose/Guangdong/1/1996(H5N1). Una vez incorporadas las secuencias de referencia, fueron alineadas en conjunto a las obtenidas en el estudio.

Se realizó filogenia mediante el software MEGA (v7.0) usando las secuencias nucleotídicas. Para reconstruir la filogenia se utilizó en primera instancia Neighbor-Joining. Luego para construir una filogenia más robusta se utilizó Maximum likelihood y para determinar el modelo de sustitución más adecuado se usó jModelTest (Darriba *et al.*, 2012; Guindon y Gascuel, 2003). Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas.

RESULTADOS

En primer lugar, las secuencias obtenidas y posteriormente evaluadas con BLAST de cada uno de los clústeres coincidieron con lo esperado, es decir, resultaron ser secuencias tipo PB2, PB1 y PA. Evidenciándose que estas eran cercanas a las observadas en virus de linaje pandémico del 2009.

Los resultados de la filogenia se pueden observar en las figuras N° 5, 6 y 7 para los segmentos, PB2, PB1 y PA, respectivamente. Cabe destacar que fueron construidos con el método de Maximum likelihood usando nucleótidos. Los modelos utilizados fueron General Time Reversible con distribución Gamma (GTR+G) para PB2 y Tamura-Nei con distribución Gamma (N93+G) para PB1 y PA, según jModelTest. Se observó que los resultados usando el Neighbor-Joining y aminoácidos eran muy similares. Esto puede ser relevante para futuros estudios. Sin embargo, debido a que las secuencias de los segmentos PB2, PB1 y PA pertenecían a un mismo clúster (pandémico) y para evidenciar mínimas sustituciones entre secuencias, se decidió utilizar el análisis de nucleótidos sobre los de aminoácidos.

De los resultados de filogenia más resultados de comparaciones pareadas, fue posible agrupar las secuencias en clústeres y *singletons* (Anexo 3). Al resumir los resultados se identificaron 17 clústeres o grupos, mediante topología y la medición de distancias pareadas, los cuales, para una mejor visualización fueron identificados por color y número. Para esto fue necesario homologar los clústeres de los distintos árboles, por lo que se definió que los clústeres de cada árbol que tenían la mayor cantidad de secuencias de los mismos virus en común tendrían el mismo color y número. Además, fue posible observar algunas secuencias que no estaban asociadas a clústeres las cuales son denominadas *singleton*, a las cuales se les asignó un mismo color. Las secuencias de referencia por su parte fueron identificadas con el color negro (Tabla N° 2).

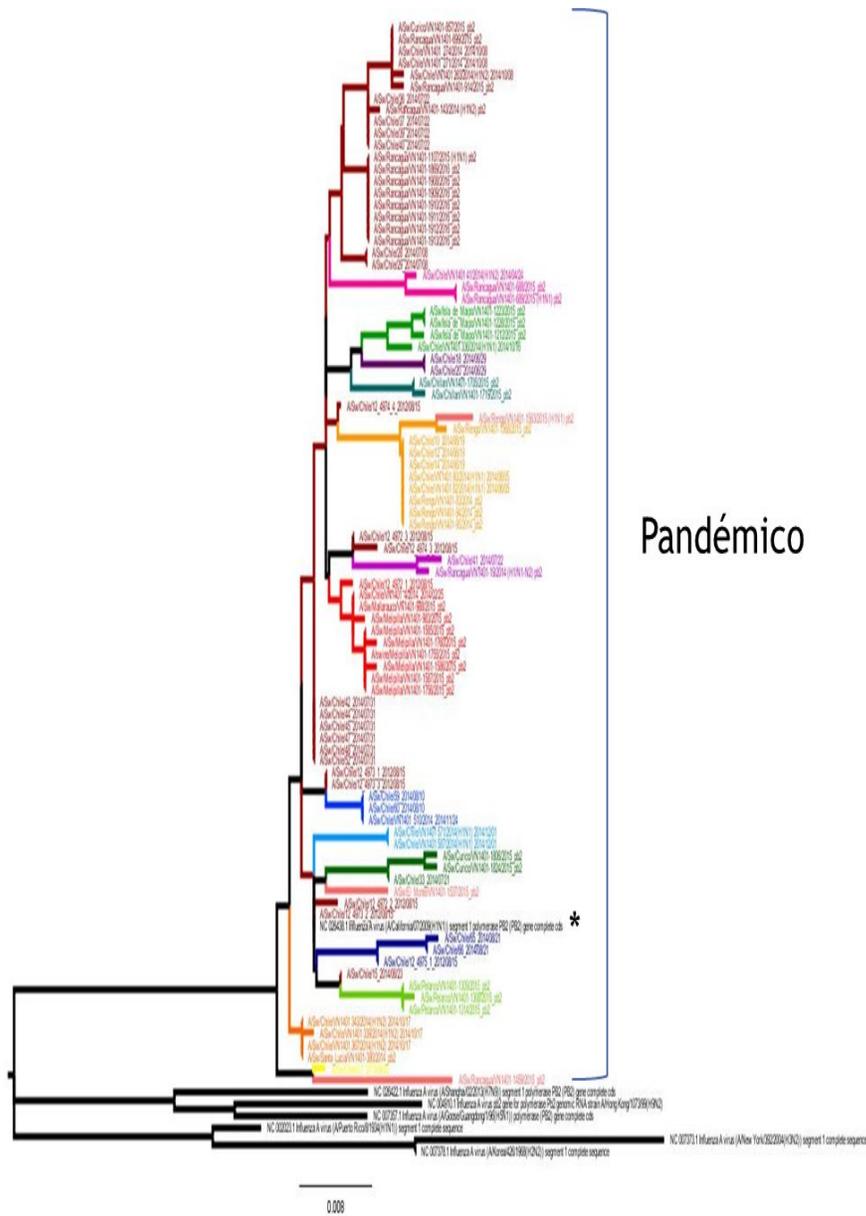


Figura N° 5- Árbol filogenético del gen PB2. El *dataset* final incluyó 89 secuencias chilenas y 7 de referencia. El árbol fue construido con el método Maximum likelihood usando el modelo General Time Reversible con distribución Gamma (GTR+G). Se distingue el clúster pandémico el cual incluye las secuencias de estudio. * Virus de referencia A/California/07/2009(H1N1).

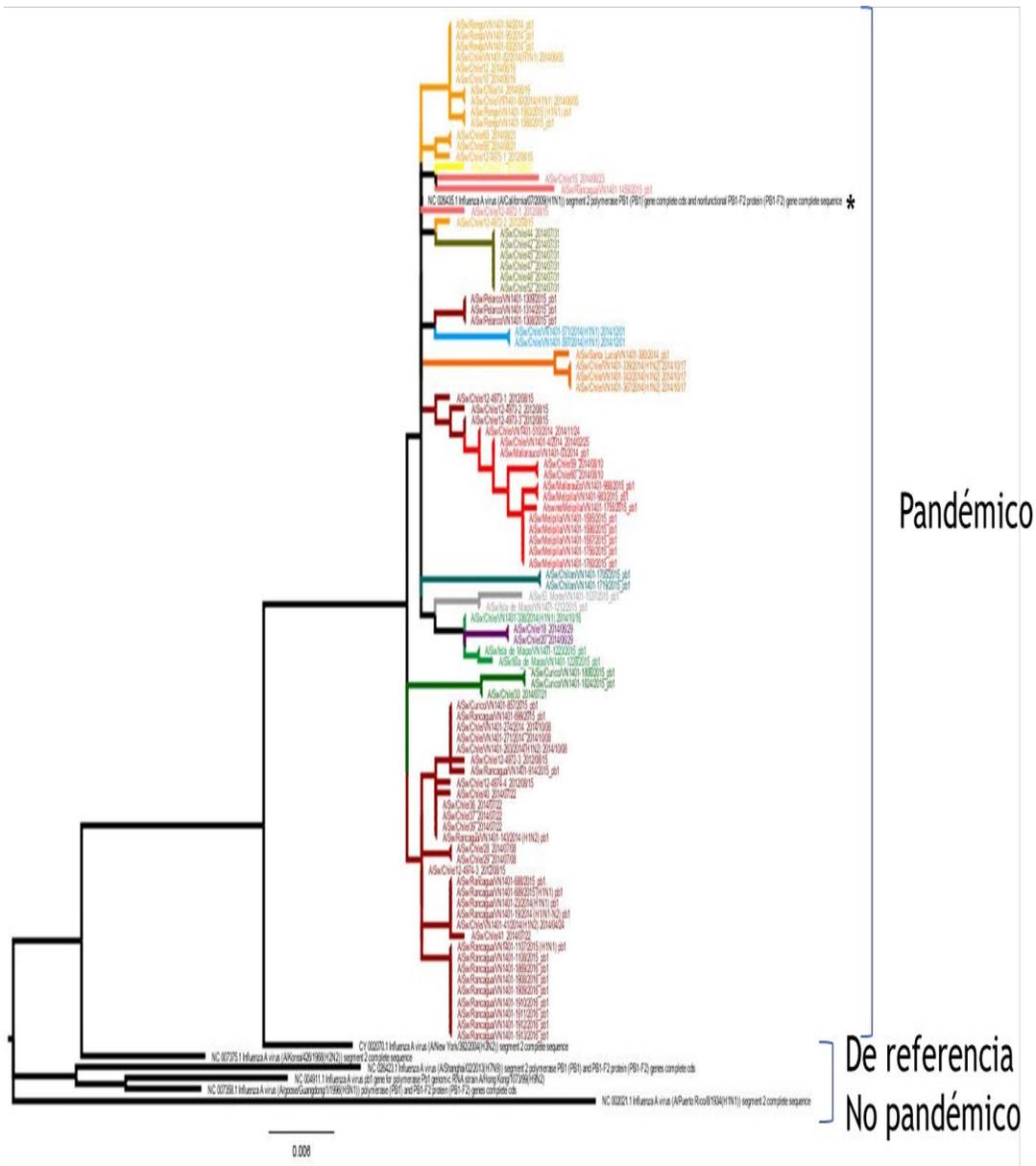


Figura N° 6- Árbol filogenético del gen PB1. El *dataset* final incluyó 92 secuencias chilenas y 7 de referencia. El árbol fue construido con el método Maximum likelihood usando el modelo Tamura-Nei con distribución Gamma (N93+G). Se distingue el clúster pandémico el cual incluye las secuencias de estudio. * Virus de referencia A/California/07/2009(H1N1).

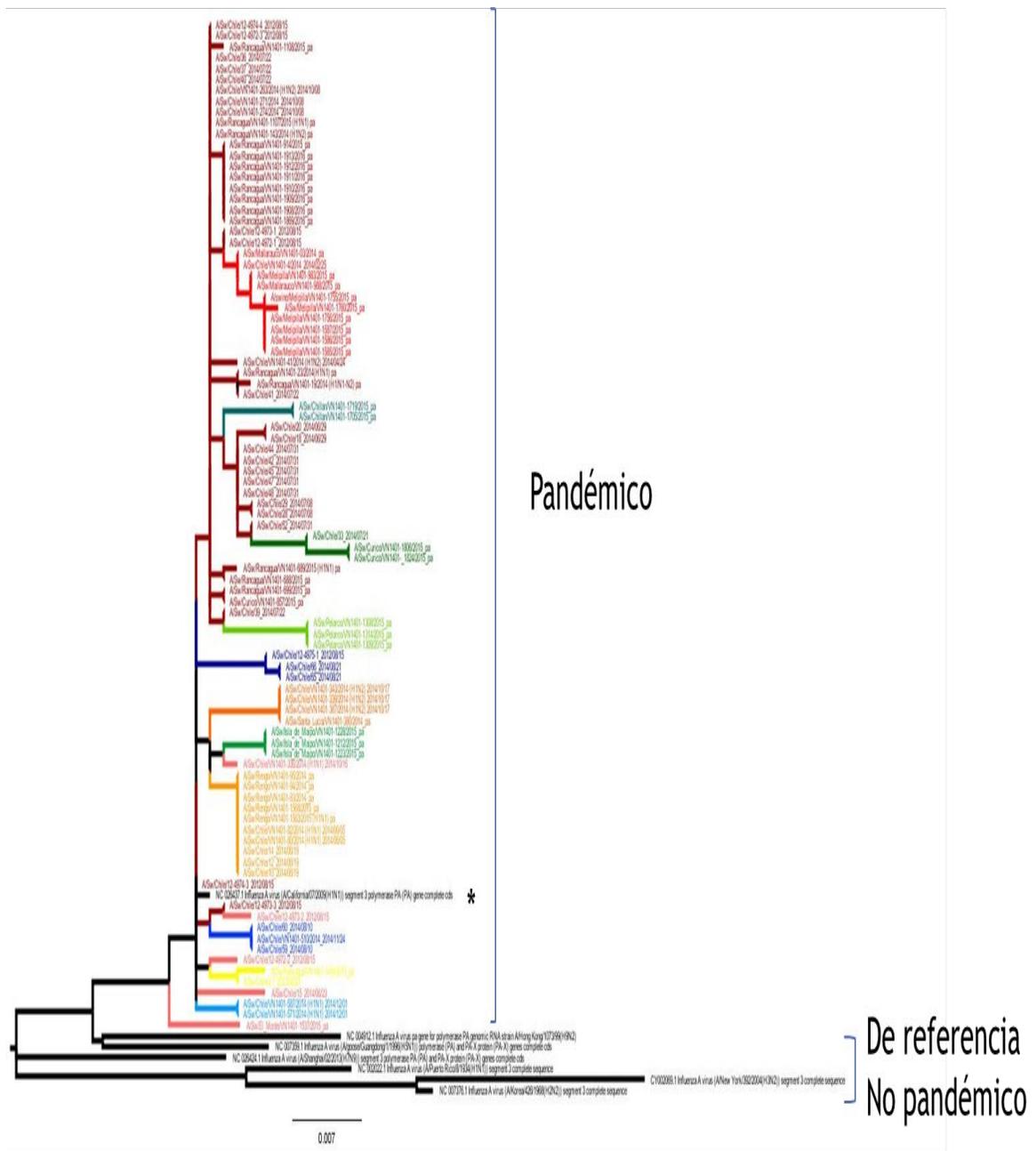


Figura N° 7- Árbol filogenético del gen PA. El *dataset* final incluyó 92 secuencias chilenas y 7 de referencia. El árbol fue construido con el método Maximum likelihood usando el modelo Tamura-Nei con distribución Gamma (N93+G). Se distingue el clúster pandémico el cual incluye las secuencias de estudio. * Virus de referencia A/California/07/2009(H1N1).

Tabla N° 2- Clústeres en colores y número de secuencias pertenecientes según tipo.

Clúster	PB2	PB1	PA
Clúster 1	35	37	42
Clúster 2	10	13	10
Clúster 3	4	4	4
Clúster 4	9	14	10
Clúster 5	1	1	2
Clúster 6	3	-	3
Clúster 7	4	3	3
Clúster 8	3	3	3
Clúster 9	2	2	2
Clúster 10	2	2	2
Clúster 11	3	-	3
Clúster 12	3	-	3
Clúster 13	2	2	-
Clúster 14	2	-	-
Clúster 15	3	-	-
Clúster 16	-	6	-
Clúster 17	-	2	-
<i>Singleton</i>	3	3	5
Secuencias de referencia	7	7	7
Total	96	99	99

La filogenia de los tres segmentos virales confirma que los virus pertenecientes a este estudio están estrechamente relacionados genéticamente con el virus A/California/07/2009(H1N1) que corresponde al virus pandémico del 2009. Por lo tanto, los virus corresponden al menos en los segmentos PB2, PB1 y PA a virus de origen humano relacionados con la pandemia del 2009 (figuras N° 5, 6 y 7).

Si se considera la información de los subtipos virales en que se determinó que los virus estudiados corresponden a los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2, siendo los dos últimos de origen pre-pandémico; se puede sugerir fuertemente que todos estos virus son virus reordenados con genes internos PB2, PB1 y PA del virus H1N1 pandémico del 2009.

Por otra parte, la filogenia de los tres segmentos virales demuestra una correlación entre clúster por segmento y el plantel porcino de donde se obtuvo las muestras. Es decir, las secuencias provenientes de un mismo plantel usualmente pertenecen al mismo clúster genético para los diferentes segmentos, sin embargo, esto no ocurre en el 100% de los casos.

Esto indicaría que han podido existir introducciones de virus o segmentos virales a planteles. Esto último puede ser debido a quiebres de bioseguridad.

En total son 31 los casos en donde no existe concordancia entre los clústeres a los que los segmentos virales pertenecen y el plantel de origen, 16 de estos corresponden a secuencias PB1 no concordantes, 6 a secuencias PB2, 4 a secuencias PA y 5 a casos donde ninguna secuencia coincide en el mismo clúster (Anexo 4). Lo observado en estos virus puede ser expuesto en 5 casos que tienen explicaciones plausibles.

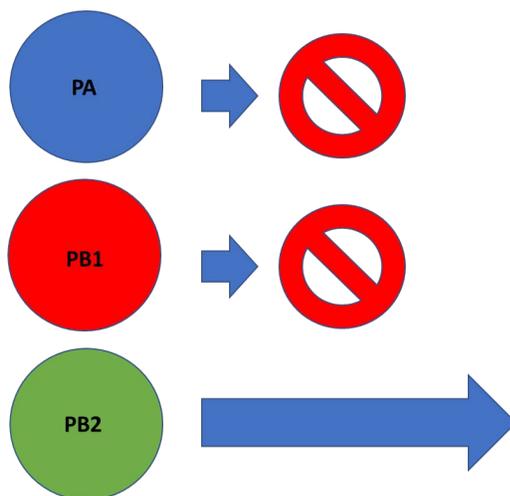
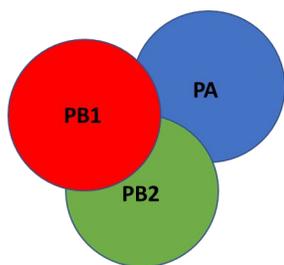
Caso 1

Corresponde a lo observado con el virus A/Sw/Chile/12-4972-2 (H1N1), perteneciente al plantel 1, aislado en 2012 versus la mayoría de los virus aislados en 2015 y 2016 pertenecientes también al plantel 1. Durante el 2012 el virus encontrado en el plantel presentó segmentos PB2 y PB1 en el clúster 1 y 4 de su respectivo árbol y su secuencia PA era un *singleton*, es decir, única dentro del análisis. Posteriormente en 2015 y 2016 se aísla el mismo subtipo de virus en el plantel, sin embargo, los segmentos PB1 y PA no correspondieron al mismo clúster previo, por lo tanto, se presume que los nuevos segmentos PB1 y PA remplazaron a los anteriores, mientras que el PB2 se mantiene (Tabla N° 3) (Figura N° 8).

Tabla N° 3- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.

Virus	Plantel	PB2	PB1	PA
A/Sw/Chile/12-4972-2 (H1N1)	1	Clúster 1	Clúster 4	<i>Singleton</i>
Virus 2015 Y 2016	1	Clúster 1	Clúster 1	Clúster 1

2012



2016

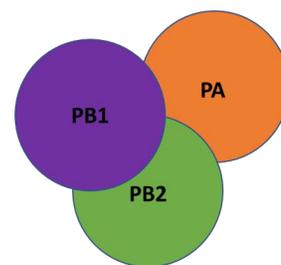


Figura N° 8- Esquema del virus FLUAV dentro de un plantel. En él se puede observar que el segmento PB2 permanece en el plantel en el transcurso del tiempo, mientras que los segmentos PB1 y PA fueron reemplazados por otros.

Caso 2

Corresponde a la dinámica observada entre virus de los planteles 9, 11 y 18, que se ubican geográficamente cercanos. Todos los virus del plantel 9 tienen sus secuencias en el clúster 7 de cada árbol a excepción del A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1212/2015 (H1N1), el cual posee un alto porcentaje de identidad en cuanto al gen PB1 con el virus A/Sw/El Monte/VN1401-1537/2015 (H1N2) del plantel 18, compartiendo ambos el clúster 17. Además, el virus A/Sw/Chile/VN1401-336/2014 (H1N1), del plantel 11, tiene sus secuencias PB2 y PB1 también en el clúster 7. Cabe mencionar que el gen PA de este último es un *singleton*, pero aun así es relativamente cercano al clúster 7 (Tabla N° 4). Esto podría explicarse por la cercanía geográfica de los tres planteles, que coexisten en un radio inferior a 20 km, funcionando el plantel 9 como receptor de virus por parte de los planteles 11 y 18 (Figura N° 9). Estos planteles no pertenecen a la misma empresa y no existe registro de intercambio de animales entre ellos, por lo que la introducción de virus desde los planteles 11 y 18 hacia el plantel 9 podría deberse al contagio por parte de los trabajadores de los planteles, que compartirían un espacio común, a los cerdos, ya sea por contagio directo o a través de

fómites. Aun así, no es posible descartar la posibilidad de un intercambio de animales entre estos tres planteles.

Tabla N° 4- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.

Virus	Plantel	PB2	PB1	PA
A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1212/2015 (H1N1)	9	Clúster 7	Clúster 17	Clúster 7
A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1223/2015 (H1N1)	9	Clúster 7	Clúster 7	Clúster 7
A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1228/2015 (H1N1)	9	Clúster 7	Clúster 7	Clúster 7
A/Sw/El Monte/VN1401-1537/2015 (H1N2)	18	Singleton	Clúster 17	Singleton
A/Sw/Chile/VN1401-336/2014 (H1N1)	11	Clúster 7	Clúster 7	Singleton

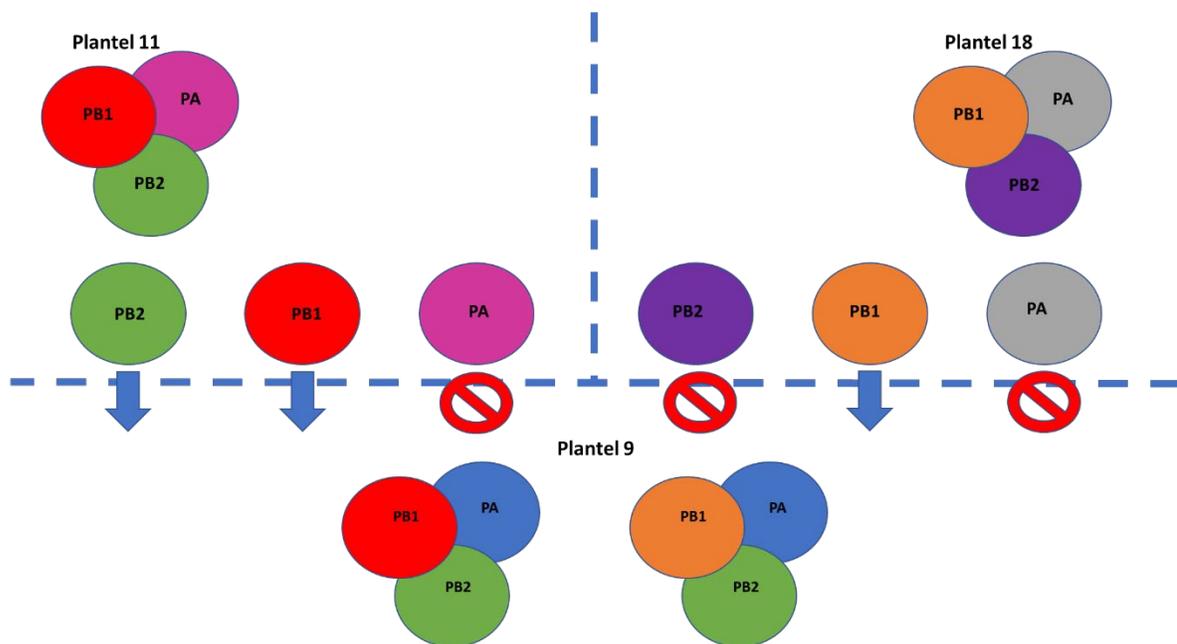


Figura N° 9- Esquema hipotético de la introducción de genes desde los planteles 11 y 18 hacia el plantel 9.

Caso 3

Este caso es similar al anterior y corresponde al de los virus del plantel 5, cuyas secuencias PB2 y PA conforman el clúster 12 de sus respectivos árboles, pero cuyas secuencias PB1 tienen un alto porcentaje de identidad con secuencias de los virus del plantel 8, compartiendo el clúster 8 (Tabla N° 5). Cabe destacar que el plantel 5 y el plantel 8 no pertenecen a la misma empresa ni existen registros de intercambio de animales entre ambos, sin embargo,

ambos se encuentran cercanos a una misma ciudad, pero alejados entre ellos. En un caso hipotético, la ciudad actuaría como un reservorio de virus, con un gen PB1 predominante. Entonces, trabajadores de estos planteles que viven en esta ciudad adquirirían alguno de estos virus con un gen PB1 común y lo introducirían a sus respectivos planteles, lo que explicaría este caso (Figura N° 10).

Tabla N° 5- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.

Virus	Plantel	PB2	PB1	PA
A/Sw/Chile/12-4975-1\HA (H1N1)	5	Clúster 12	Clúster 4	Clúster 12
A/Sw/Chile/65 (H1N1)	5	Clúster 12	Clúster 4	Clúster 12
A/Sw/Chile/66 (H1N1)	5	Clúster 12	Clúster 4	Clúster 12
Virus del plantel 8	8	Clúster 4	Clúster 4	Clúster 4

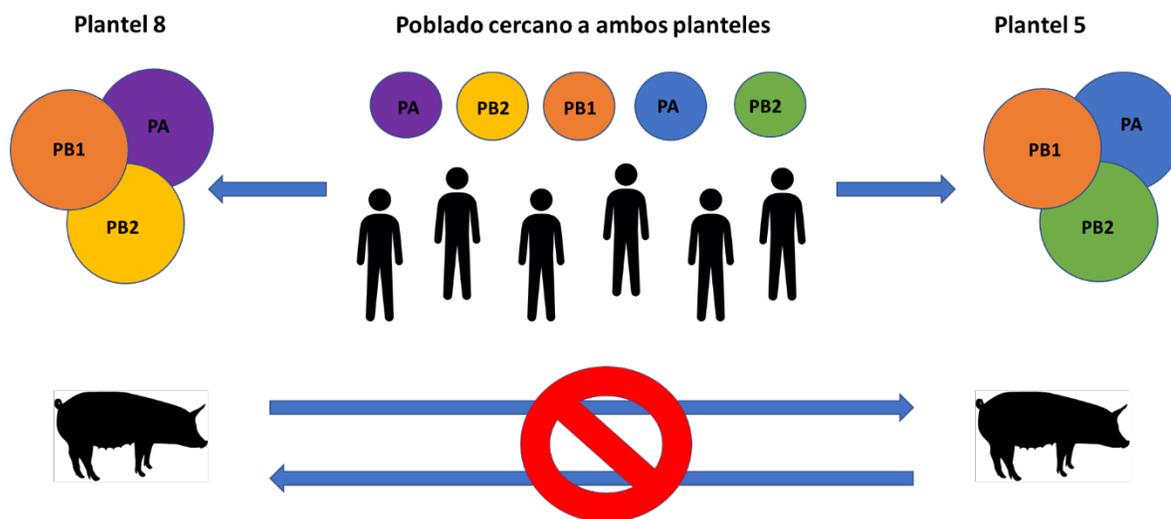


Figura N° 10- Esquema hipotético de la transmisión de virus mediante trabajadores de distintos planteles que comparten un espacio común.

Caso 4

Corresponde a los virus del plantel 27, cuyas secuencias PB2 y PA tienen un alto porcentaje de identidad con la mayoría de los virus del plantel 1, perteneciendo todas al clúster 1 de cada árbol. No así sus secuencias PB1 que forman un clúster totalmente independiente, el clúster 16 (Tabla N° 6). Estos virus son producto de la introducción de animales desde el plantel 1 al plantel 27. Al realizar la investigación epidemiológica del caso, se constató que el plantel 1 vendió cerdos destetados al plantel 27 previo al muestreo, debido a la despoblación del sitio

1 de este último causada por de la introducción del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSv por sus siglas en inglés) (Figura N° 11).

Tabla N° 6- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.

Virus	Plantel	PB2	PB1	PA
A/Sw/Chile/42 (H1N2)	27	Clúster 1	Clúster 16	Clúster 1
A/Sw/Chile/44 (H1N2)	27	Clúster 1	Clúster 16	Clúster 1
A/Sw/Chile/45 (H1N2)	27	Clúster 1	Clúster 16	Clúster 1
A/Sw/Chile/47 (H1N2)	27	Clúster 1	Clúster 16	Clúster 1
A/Sw/Chile/48 (H1N2)	27	Clúster 1	Clúster 16	Clúster 1
A/Sw/Chile/52 (H1N2)	27	Clúster 1	Clúster 16	Clúster 1
Virus del plantel 1	1	Clúster 1	Clúster 1	Clúster 1

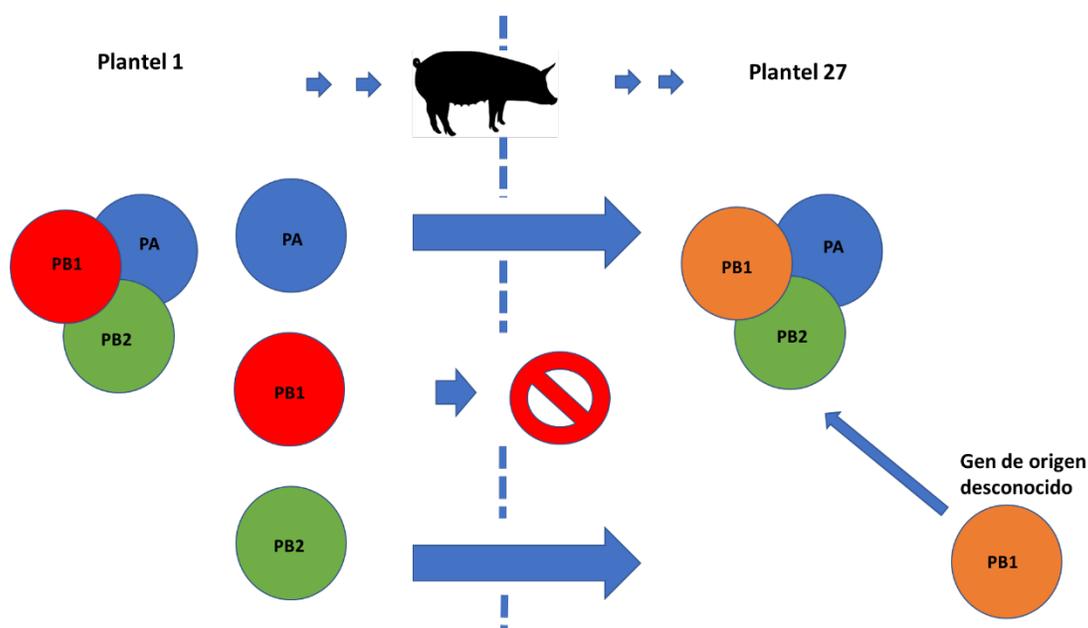


Figura N° 11- Esquema hipotético del reordenamiento genético de un virus de genes conocidos con otro de origen desconocido. En él se puede observar como un virus introducido al plantel, se reordenó con otros adquiriendo un gen PB1 de origen desconocido.

Caso 5

Corresponde a la situación de algunos virus como el A/Sw/Rengo/VN1401-1563/2015 (H1N1), perteneciente al plantel 8, cuyas secuencias PB1 y PA pertenecen al clúster 4 de sus respectivos árboles, pero cuya secuencia PB2 es una secuencia *singleton*, cercana al clúster 4, de acuerdo con el criterio usado (Tabla N° 7). Esto puede deberse a la variabilidad del gen,

el cual en un principio pudo haber pertenecido al clúster 4 pero con el paso del tiempo se fue distanciando, transformándose en un *singleton*.

Tabla N° 7- Virus, plantel de origen y clúster al cual pertenecen sus secuencias.

Virus	Plantel	PB2	PB1	PA
A/Sw/Rengo/VN1401-1563/2015 (H1N1)	8	<i>Singleton</i>	Clúster 4	Clúster 4
Virus del plantel 8	8	Clúster 4	Clúster 4	Clúster 4

DISCUSIÓN

El presente estudio permitió entregar mayor conocimiento acerca de la diversidad genética de los genes PB2, PB1 y PA de FLUAV de origen porcino, entre los años 2012 y 2016.

En primera instancia, los resultados indican que los virus del estudio, es decir, virus procedentes de planteles porcinos chilenos, son resultado de reordenamientos genéticos de virus de origen pre-pandémico con el virus H1N1 pandémico del 2009. Esto coincidiría, en parte, con lo dicho anteriormente por García en 2017 y Tapia *et al.* en 2018, los que proponen que, a pesar del reordenamiento de los genes HA y NA entre virus pre-pandémicos y pandémicos, los genes internos (PB2, PB1, PA, NP, M y NS) de los virus aislados en Chile poseen un alto porcentaje de identidad con los del virus H1N1 pandémico del 2009.

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que existe un reordenamiento, entre distintos virus, de los genes que codifican para el complejo polimerasa de FLUAV. Esto ya se ha visto en una gran cantidad de estudios con otros segmentos virales, como los que codifican para la HA y la NA. En comparación, son pocos los estudios que abordan el estudio de los segmentos 1, 2 y 3 y menos los que lo hacen de manera específica.

Como se mencionó anteriormente, 3 de las 4 pandemias de influenza fueron provocadas por virus reordenados. En el caso de la pandemia de 1957, el virus que la provocó fue el resultado de un reordenamiento entre virus humanos y aviáres, siendo los genes HA, NA y PB1 aportados por un virus aviar H2N2 y los demás por un H1N1. Por otro lado, en el caso de la pandemia de 1968, esta fue provocada por un virus producto de un reordenamiento entre virus aviáres y humanos, siendo los genes HA y PB1 del virus de la pandemia anterior (H2N2) reemplazados por los de otro virus aviar (García, 2017).

Otro estudio que describe un caso similar es el de De Silva *et al.* en 2012. En él se describe que virus triple reordenados H3N2 de Canadá, estudiados por Olsen *et al.* en 2006, poseen un gen PB1 de un linaje distinto del de los otros genes de la polimerasa.

Soltanialvar *et al.* (2012) describe una situación parecida a la anterior. En su estudio con virus de origen aviar H9N2 de Irán entre 1999 y 2009 se puede observar para algunos de estos virus que el gen PB1, como en el caso anterior, posee un linaje distinto al resto de los

otros genes de la polimerasa. Estos estudios coincidirían con los resultados encontrados en el presente trabajo.

Por otro lado, cabe señalar que existen investigaciones que plantean que estos reordenamientos no son del todo aleatorios y que están suscritos a la compatibilidad de los distintos segmentos, como es el caso del estudio realizado por Li *et al.* en 2008, el cual plantea que la compatibilidad de los segmentos que conforman la polimerasa afecta directamente su desempeño, y este a su vez influye en la viabilidad y competitividad que pueda tener un virus, y por tanto, la subsistencia de este virus reordenado.

Dentro del contexto de la producción porcina intensiva, las formas más comunes de vulneración a los sistemas de bioseguridad y por ende de introducción de nuevos virus a un plantel son por la adquisición de animales infectados de otro plantel o empresa, o por fenómenos de zoonosis reversa, es decir, contagio desde humanos a animales. Otras formas descritas son el consumo por parte de los cerdos de aguas contaminadas con heces de aves infectadas con el virus (Arce, 2015).

Respecto a los casos abordados estos pueden explicarse según la literatura:

Existen distintos estudios que proponen que no todas las combinaciones de los genes que constituyen el complejo polimerasa de FLUAV son competitivos y/o viables. Por lo tanto, se presume que el virus A/Sw/Chile/12-4972-2 (H1N1), del caso 1, fue reordenándose con otros, dando origen a los virus más actuales, que presentarían una combinación de genes constituyentes de la polimerasa más competitiva (Li, *et al.*, 2008).

En el caso 2 y 3, el ser humano jugaría un rol preponderante en la introducción de nuevos virus al plantel. Cabe mencionar que para ambos casos la cercanía geográfica de los planteles es un factor importante, pues en el caso 2 los planteles se encontraban a escasos metros de distancia, y en el caso 3 ambos se encontraban a pocos kilómetros de distancia de una ciudad, la que podría albergar a trabajadores de ambos planteles. El rol del ser humano en la transmisión de FLUAV ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado el contagio desde los humanos a los cerdos del virus H1N1 pandémico del 2009 (García, 2016; Gray *et al.* 2007). Para el caso 2 además, por la cercanía geográfica aun mayor de los planteles involucrados, la transmisión del virus pudo haber sido por intercambio de animales o mediante fómites (Arce, 2015).

En cuanto al caso 4, este se puede describir con la figura N° 11, caso en el cual un plantel adquirió de otro, animales infectados, los cuales contagiaron a la población existente, produciendo virus reordenados con un gen PB1 de origen desconocido. No existen registros del estatus sanitario del plantel previo al intercambio de animales ni mucho menos aislados virales de este respecto a FLUAV. Además, dicho gen no posee parentesco estrecho con ninguno de los virus evaluados en este estudio, por lo que se hace difícil determinar el origen de este.

En lo que respecta a la situación del caso 5, esta podría deberse a la alta capacidad de mutar que posee FLUAV dada la falta de actividad correctora por parte del complejo polimerasa. Como se mencionó anteriormente, esto produce mutaciones en el genoma al momento de la replicación, lo que podría explicar la diferenciación de un gen respecto a su antecesor. (Boivin *et al.*, 2010).

Se pudo observar, además, que la mayoría de los casos en los cuales los tres clústeres de cada secuencia no coincidían en un mismo plantel eran dados por las secuencias PB1 (Anexo 4). Hasta el momento no existen estudios sobre cual o cuales de estos segmentos tiende a reordenarse en mayor grado que el resto y el presente no pretende profundizar en el análisis de reordenamiento clásico, por lo que sería interesante estudiarlo y analizarlo en trabajos posteriores.

Finalmente, cabe mencionar que existieron algunas limitantes del trabajo, como el hecho que existen mínimas diferencias entre las secuencias analizadas y, por ende, no aplican para un análisis de reordenamiento clásico, por lo que las ideas expuestas en el presente deben tomarse con cautela. Por otro lado, el criterio de clasificación de las secuencias también presentó dificultades debido a la gran cantidad de secuencias basales cercanas al clúster 1, lo que le confiere cierta subjetividad a la clasificación.

CONCLUSIÓN

Mediante la creación de los árboles filogenéticos para cada segmento y la clasificación de las secuencias en clúster fue posible evaluar la diversidad genética de los genes PB2, PB1 y PA de virus porcinos chilenos y a raíz de su análisis se sugiere la existencia de reordenamientos independientes de los tres segmentos.

Por lo tanto, la hipótesis de este estudio es refutada en cuanto a que no se observarían reordenamientos independientes de estos genes, puesto que los resultados lo sugieren en aproximadamente un 35% de los virus estudiados que podrían corresponder a virus reordenados en alguno de estos tres segmentos. Por otro lado, no se descarta el hecho de que estos hayan coevolucionado formando un *cassette* genético y que pueda haber combinaciones más o menos eficientes que otras.

En esta misma línea, el hecho de que todos los virus de estudio sean virus reordenados con genes internos pandémicos, sugeriría que la compatibilidad de los segmentos que conforman la polimerasa, en virus de este origen, les otorga una mayor competitividad respecto a los virus pre-pandémicos.

BIBLIOGRAFÍA

- **ARCE, R.** 2015. Detección y aislamiento del virus influenza A en porcinos de sistemas de producción intensiva en la Zona Central de Chile. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 29.
- **BACKLUND, A.** 2010. Topical chemical space relation to biological space. **In:** Liu, H.; Marder, L. (Eds). Comprehensive Natural Products II, Elsevier. pp. 47-79.
- **BOIVIN, S.; CUSACK, S.; RUIGROK, R.; HART, D.** 2010. Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 285(37):28411-28416.
- **DARRIBA, D.; TABOADA, G.; DOALLO, R.; POSADA, D.** 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- **DE SILVA, U.; TANAKA, H.; NAKAMURA, S.; GOTO, N.; YASUNAGA, T.** 2012. Comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus. *Biology Open* 1(4):385-390.
- **DIAS, A.; BOUVIER, D.; CREPIN, T.; MCCARTHY, A.; HERT, D. BAUDIN, F.; CUSACK, S.; RUIGROK, R.** 2009. The cap-snatching endonuclease of Influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458:914-916.
- **DLUGOLENSKI, D.; JONES, L.; HOWARTH, 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. *Journal of Virology* 89(10):5651-5667.
- **GARCIA, V.** 2016. Diversidad genética del gen de la neuraminidasa en el virus de influenza A de origen porcino durante los años 2013-2014. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 38p.

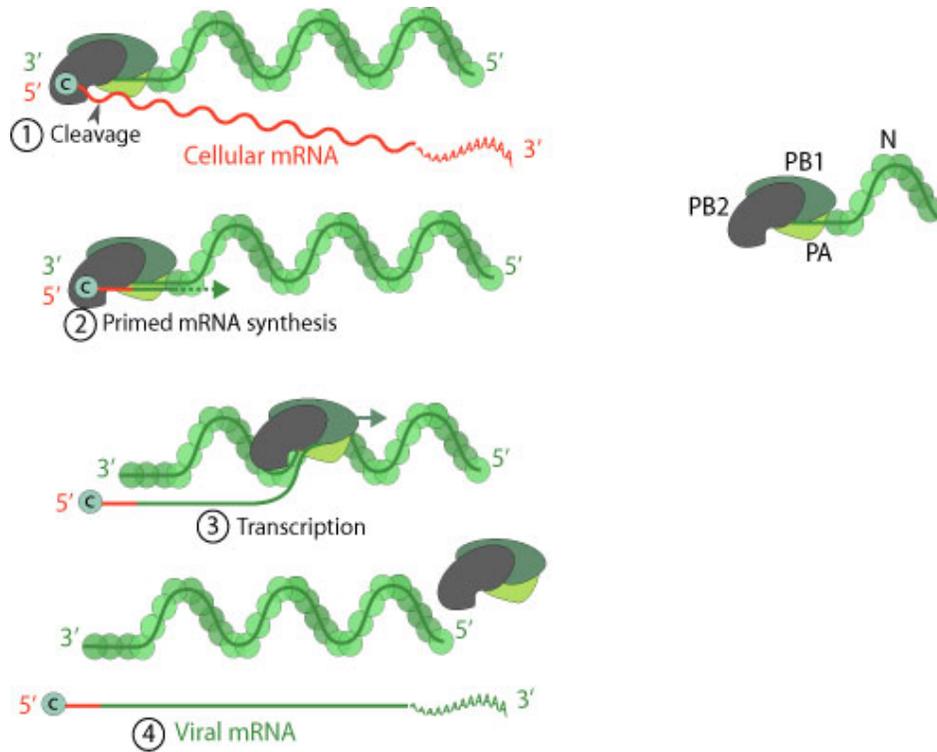
- **GARCIA, V.** 2017. Variabilidad genética del virus influenza A en planteles porcinos chilenos entre 2012 y 2016. Tesis para optar al grado de magister en ciencias animales y veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 95p.
- **GRAY, G.; MCCARTHY, T.; CAPUANO, A.; SETTERQUIST, S.; OLSEN, C.; ALAVANIA, M.; LYNCH, C.** 2007. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerging Infectious Diseases* 13(12):1871-1878.
- **GUINDON, S.; GASCUEL, O.** 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52: 696-704.
- **HE, X.; ZHOU, J.; BARTLAM, M.; ZHANG, R.; MA, J.; LOU, Z.; LI, X.; LI, J. JOACHIMIAK, A.; ZENG, Z.; GE, R.; RAO, Z.; LIU, Y.** 2008. Crystal structure of the polymerase PAC-PB1N complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* 454:1123-1126.
- **KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K.** 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 7.0. *Biología Molecular y Evolución*: 33 1870-1874.
- **LI, C.; HATTA, M.; WATANABE, S.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y.** 2008. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *Journal of Virology*, 82(23):11880-11888.
- **MURAKAMI, S.; ENDOH, M.; KOBAYASHI, T.; TAKENAKA-UEMA, A.; CHAMBERS, J.; UCHIDA, K.; NISHIHARA, M.; HAUSE, B.; HORIMOTO, T.** 2016. Influenza D virus infection in herd of cattle, Japan. *Emerging Infectious Diseases*. CDC 20(8):1517-1519.
- **OLSEN, C.; KARASIN, A.; CARMAN, S.; BASTIEN, N.; OJKIC, D.; ALVES, D.; CHARBONNEAU, G.; HENNING, B.; LOW, D.; BURTON, L.; BROUKHNSKI, G.** 2006. Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerging Infectious Diseases*, 12(7), 1132-1135.

- **PATEL, D.; SCHULTZ, W.; UMLAND, C.** 2012. Influenza A polymerase subunit PB2 possesses overlapping binding sites for polymerase subunit PB1 and human MAVS proteins. *Viral Research* 172(2013):75-79.
- **PLANT, E.; YE, S.** 2013. Gene constellation of influenza vaccine seed viruses. *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*. pp. 213-229.
- **PLESCHKA, S.** 2012. Overview of influenza viruses. **In:** Richt, J.; Webby, R. (Eds.). *Swine Influenza*. Springer. pp. 1-13.
- **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. *Journal of Virology. Methods*. 193(2):394-404.
- **SOLTANIALVAR, M.; GOODARZI, R.; AKBARNEJAD, F.** 2012. Genetic analysis of polymerase complex (PA, PB1 and PB2) genes of H9N2 avian influenza viruses from Iran (1999 to 2009). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(11): 858-862.
- **TAPIA, R.; GARCIA, V.; BUCAREY, S.; BARRIGA, G.; MEDINA, R.; NEIRA, V.** 2016. Características genéticas y antigénicas del gen de hemaglutinina de virus de influenza de origen porcino en Chile. XIX Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Pucón, Chile.
- **TAPIA, R.; GARCIA, V.; MENA, J.; BUCAREY, S.; MEDINA, R.; NEIRA, V.** 2018. Infection of novel reassortant H1N2 and H3N2 swine influenza A viruses in the guinea pig model. *Veterinary Research*. pp 1-8.
- **URBANIAK, K.; MARKOWSKA-DANIEL, I.** 2014. *In vivo* reassortment of Influenza viruses. *Acta Biochim Pol.*61(3):427-431.
- **VIRALZONE.** 2017. Cap snatching. [en línea]. <http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/839.html> [consulta : 17-05-2017].

- **WISE, H.; FOEGLEIN, A.; SUN, J.; DALTON, R.; PATELL, S.; HOWARD, W.; ANDERSON, E.; BARCLAY, W.; DIGARD, P.** 2009. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of Virology* 83(16):8021-8030.
- **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: 23-05-2017].
- **YAMAYOSHI, S.; WATANABE, M.; GOTO, H.; KAWAOKA, Y.** 2016. Identification of a novel viral protein expressed from the PB2 segment of influenza A virus. *Journal of Virology* 90(1):444-454.
- **YEWDELL, J.; INCE, W.** 2012. Frameshifting to PA-X influenza. *Science* 337(6091):164-165.
- **ZELL, R.; SCHOLTISSEK, C.; LUDWING, S.** 2012. Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of european swine influenza viruses. **In:** Richt, J.; Webby, R. (Eds.). *Swine Influenza*. Springer. pp. 29-32.
- **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. *Journal of Virology*. 83:10309-10313.

ANEXOS

Anexo 1- Proceso de transcripción mediado por *cap-snatching*.



Anexo Figura N° 1- Esquema del proceso de transcripción mediado por *cap-snatching*.
(ViralZone, 2017).

Anexo 2- Número de muestras según plantel y región geográfica.

Plantel	Muestras totales	Región
1	491	Región de O'Higgins
2	48	Región del Maule
3	136	Región Metropolitana
4	113	Región de Valparaíso
5	59	Región de O'Higgins
6	115	Región Metropolitana
7	34	Región Metropolitana
8	120	Región Metropolitana
9	81	Región Metropolitana
10	65	Región del Bío-Bío
11	125	Región Metropolitana
12	163	Región de O'Higgins
13	58	Región Metropolitana
14	109	Región del Maule
15	56	Región de O'Higgins
16	125	Región del Bío-Bío
17	57	Región Metropolitana
18	67	Región Metropolitana
19	65	Región de O'Higgins
20	15	Región Metropolitana
21	138	Región del Bío-Bío
22	20	Región de La Araucanía
23	8	Región de O'Higgins
24	72	Región de O'Higgins
25	147	Región del Maule
26	30	Región Metropolitana
27	69	Región de O'Higgins
28	37	Región del Maule
29	75	Región del Bío-Bío
30	38	Región Metropolitana
31	36	Región Metropolitana
32	34	Región de O'Higgins
33	18	Región Metropolitana

Anexo 3- Virus, plantel al que pertenecen y clúster según tipo de secuencia.

Virus	Plantel	PB2	PB1	PA
A/Sw/Chile/12-4972-2\HA (H1N1)	1	1	4	sin
A/Sw/Chile/12-4972-3\HA (H1N1)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/12-4974-3\HA (H1N1)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/12-4974-4\HA (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/36 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/37 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/39 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/40 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/41 (H1N1)	1	14	1	1
A/Sw/Chile/VN1401-263/2014 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/VN1401-271/2014 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/VN1401-274/2014 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/VN1401-41/2014 (H1N2)	1	15	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1107/2015 (H1N1)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1108/2015 (H1N1)	1	-	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-143/2014 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1869/2016 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-19/2014 (H1/N1-N2)	1	14	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1908/2016 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1909/2016 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1910/2016 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1911/2016 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1912/2016 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1913/2016 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-23/2014 (H1N1)	1	-	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-688/2015 (H1N1)	1	15	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-689/2015 (H1N1)	1	15	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-699/2015 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-914/2015 (H1N2)	1	1	1	1
A/Sw/Chile/2.7 (H1N1)	2	5	5	5
A/Sw/Chile/59	3	11	2	11
A/Sw/Chile/60	3	11	2	11
A/Sw/Chile/VN1401-4/2014 (H1N2)	3	2	2	2
A/Sw/Chile/VN1401-510/2014 (H1N1)	3	11	2	11
A/Sw/Mallarauco/VN1401-03/2014 (H1N2)	3	-	2	2
A/Sw/Mallarauco/VN1401-988/2015 (H1N2)	3	2	2	1
A/Sw/Melipilla/VN1401-1755/2015 (H1N2)	3	2	2	2

A/Sw/Melipilla/VN1401-1756/2015 (H1N2)	3	2	2	2
A/Sw/Melipilla/VN1401-1760/2015 (H1N2)	3	2	2	2
A/Sw/Melipilla/VN1401-983/2015 (H1N2)	3	2	2	2
A/Sw/Chile/VN1401-571/2014 (H1N1)	4	10	10	10
A/Sw/Chile/VN1401-587/2014 (H1N1)_1	4	10	10	10
A/Sw/Chile/12-4975-1\HA (H1N1)	5	12	4	12
A/Sw/Chile/65 (H1N1)	5	12	4	12
A/Sw/Chile/66 (H1N1)	5	12	4	12
A/Sw/Melipilla/VN1401-1585/2015 (H1N2)	6	2	2	2
A/Sw/Melipilla/VN1401-1586/2015 (H1N2)	6	2	2	2
A/Sw/Melipilla/VN1401-1587/2015 (H1N2)	6	2	2	2
A/Sw/Chile/12-4972-1\HA (H1N2)	7	2	sin	1
A/Sw/Chile/12-4973-1\HA (H1N1)	7	1	1	1
A/Sw/Chile/12-4973-2\HA (H1N1)	7	1	1	sin
A/Sw/Chile/12-4973-3\HA (H1N1)	7	1	1	1
A/Sw/Chile/10 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Chile/12 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Chile/14 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Chile/VN1401-80/2014 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Chile/VN1401-82/2014 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Rengo/VN1401-1563/2015 (H1N1)	8	sin	4	4
A/Sw/Rengo/VN1401-1568/2015 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Rengo/VN1401-83/2014 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Rengo/VN1401-94/2014 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Rengo/VN1401-95/2014 (H1N1)	8	4	4	4
A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1212/2015 (H1N1)	9	7	17	7
A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1223/2015 (H1N1)	9	7	7	7
A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1228/2015 (H1N1)	9	7	7	7
A/Sw/Chile/VN1401-336/2014 (H1N1)	11	7	7	sin
A/Sw/Chile/28 (H1N2)	12	1	1	1
A/Sw/Chile/29 (H1N2)	12	1	1	1
A/Sw/Chile/VN1401-339/2014 (H1N2)	12	3	3	3
A/Sw/Chile/VN1401-343/2014 (H1N2)	12	3	3	3
A/Sw/Chile/VN1401-367/2014 (H1N2)	12	3	3	3
A/Sw/Santa Lucía/VN1401-380/2014 (H1N1)	12	3	3	3
A/Sw/Pelarco/VN1401-1308/2015 (H1N1)	14	6	1	6
A/Sw/Pelarco/VN1401-1309/2015 (H1N1)	14	6	1	6
A/Sw/Pelarco/VN1401-1314/2015 (H1N1)	14	6	1	6
A/Sw/Chillán/VN1401-1705/2015 (H1N1)	16	9	9	9
A/Sw/Chillán/VN1401-1719/2015 (H1N1)	16	9	9	9

A/Sw/El Monte/VN1401-1537/2015 (H1N2)	18	sin	17	sin
A/Sw/Chile/15 (H1N1)	20	1	sin	sin
A/Sw/Chile/18 (H1N1)	21	13	13	1
A/Sw/Chile/20 (H1N1)	21	13	13	1
A/Sw/Chile/33 (H3N2)	25	8	8	8
A/Sw/Curicó/VN1401-1806/2015 (H3N2)	25	8	8	8
A/Sw/Curicó/VN1401-1824/2015 (H3N2)	25	8	8	8
A/Sw/Chile/42 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/44 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/45 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/47 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/48 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/52 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Curicó/VN1401-857/2015 (H1N2)	28	1	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1459/2015 (H1N1)	33	sin	sin	5

*sin: secuencia *singleton*.

Anexo 4- Virus cuyas secuencias no coincidieron en el mismo clúster de cada árbol, según plantel y tipo de secuencia.

Virus	Plantel	PB2	PB1	PA
A/Sw/Chile/12-4972-2 (H1N1)	1	1	4	sin
A/Sw/Chile/41 (H1N1)	1	14	1	1
A/Sw/Chile/VN1401-41/2014 (H1N2)	1	15	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-19/2014 (H1/N1-N2)	1	14	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-688/2015 (H1N1)	1	15	1	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-689/2015 (H1N1)	1	15	1	1
A/Sw/Chile/59	3	11	2	11
A/Sw/Chile/60	3	11	2	11
A/Sw/Chile/VN1401-510/2014 (H1N1)	3	11	2	11
A/Sw/Chile/12-4975-1\HA (H1N1)	5	12	4	12
A/Sw/Chile/65 (H1N1)	5	12	4	12
A/Sw/Chile/66 (H1N1)	5	12	4	12
A/Sw/Chile/12-4972-1\HA (H1N2)	7	2	sin	1
A/Sw/Chile/12-4973-2\HA (H1N1)	7	1	1	sin
A/Sw/Rengo/VN1401-1563/2015 (H1N1)	8	sin	4	4
A/Sw/Isla de Maipo/VN1401-1212/2015 (H1N1)	9	7	17	7
A/Sw/Chile/VN1401-336/2014 (H1N1)	11	7	7	sin
A/Sw/Pelarco/VN1401-1308/2015 (H1N1)	14	6	1	6
A/Sw/Pelarco/VN1401-1309/2015 (H1N1)	14	6	1	6
A/Sw/Pelarco/VN1401-1314/2015 (H1N1)	14	6	1	6
A/Sw/El Monte/VN1401-1537/2015 (H1N2)	18	sin	17	sin
A/Sw/Chile/15 (H1N1)	20	1	sin	sin
A/Sw/Chile/18 (H1N1)	21	13	13	1
A/Sw/Chile/20 (H1N1)	21	13	13	1
A/Sw/Chile/42 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/44 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/45 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/47 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/48 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Chile/52 (H1N2)	27	1	16	1
A/Sw/Rancagua/VN1401-1459/2015 (H1N1)	33	sin	sin	5

*sin: secuencia *singleton*.