



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

**Re-descubriendo Influenza A humana en Chile: análisis retrospectivo del  
gen de la Hemaglutinina (HA)**

**Celia Alejandra Pavez Cáceres**

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

PROFESOR GUÍA: Víctor Manuel Neira Ramírez, MV, PhD.  
Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO: Fondecyt 11170877, 1211517, Laboratorio de Virología Animal FAVET,  
CEIRS NIH HHSN272201400008C y HHSN75N9301R00028

SANTIAGO, CHILE  
2021



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

**Re-descubriendo Influenza A humana en Chile: análisis retrospectivo  
del gen de la Hemaglutinina (HA)**

**Celia Alejandra Pavez Cáceres**

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

Nota final: .....

Profesor Guía: Víctor Neira R. ....  
Profesor corrector: José Pizarro L. ....  
Profesor corrector: Gonzalo Barriga P. ....

SANTIAGO, CHILE  
2021

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todos aquellos que me acompañaron en este proceso, en especial a mi profesor guía, el Dr. Victor Neira, quien fue un excelente docente y persona, gracias a su paciencia y buena disposición aprendí mucho y logré realizar este trabajo. También mi agradecimiento al Dr. Juan Mena, quien me acompañó en mi aprendizaje en las técnicas de laboratorio y fue un gran apoyo al inicio de este camino. Igualmente mis más sinceros agradecimientos a las personas del laboratorio de virología, que con muy buena voluntad me recibieron y resolvieron dudas que iban surgiendo.

No puedo dejar de agradecer a mis profesores guías el Dr. Pizarro y el Dr. Barriga que tuvieron la buena disposición de leer mis avances y resolver mis dudas.

También mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me han dado el apoyo incondicional en todo este proceso, a mi madre, mi padre y hermanos, quienes muchas veces me dieron el ánimo que me faltaba para poder seguir con el curso de la carrera. A mis amigos, los cuales jamás dejaron de confiar en mí y me llenaron de buenos momentos.

A mi pareja Nicolás, quien es mi pilar y mi familia. Muchas gracias por siempre apoyarme y darme ese empujón que muchas veces me hacía falta.

## ÍNDICE DE DE CAPÍTULOS

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Revisión bibliográfica .....</b>	<b>2</b>
Información general de virus influenza A.....	2
Proteína hemaglutinina .....	3
Historia de los virus influenza A en humanos... ..	3
Situación nacional... ..	5
Justificación del estudio .....	5
<b>Hipótesis.....</b>	<b>6</b>
Objetivo general: variabilidad genética del gen HA en subtipos y su filogenia entre los años 1996 y 2007 .....	6
Objetivo específico 1: variabilidad genética en subtipos del gen HA de acuerdo a los años de obtención.....	6
Objetivo específico 2: filogenia de las secuencias chilenas de acuerdo con los años de obtención.....	6
<b>Material y métodos .....</b>	<b>7</b>
Diseño del estudio... ..	7
Secuenciación del genoma.....	7
Análisis filogenético... ..	8
Análisis estadístico... ..	9
Bioseguridad... ..	9
<b>Resultados.....</b>	<b>11</b>

Resultados generales del diagnóstico.....	11
Análisis exploratorio preliminar... ..	12
Adición de secuencias... ..	13
Filogenias finales .....	14
Árbol final H1... ..	14
Árbol final H3... ..	16
<b>Discusión.....</b>	<b>19</b>
<b>Conclusión .....</b>	<b>21</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>22</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>28</b>
Anexo 1: certificado de bioseguridad .....	28
Anexo 2: diagnóstico viral .....	29
Propagación viral... ..	29
RT-PCR y subtipificación... ..	30

## INDICÉ DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de subtipos HA identificados en el estudio según año.....	11
<b>Tabla 2.</b> Número de secuencias obtenidas para el gen HA subtipo H3 y H1 del estudio, chilenas y mundiales .....	14

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema resumen de las actividades realizadas en el estudio .....	10
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético exploratorio H1 .....	12
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético exploratorio H3 .....	13
<b>Figura 4.</b> Árbol Filogenético H1 HKY + G 1000 repeticiones.....	15
<b>Figura 5.</b> Árbol Filogenético H3 HKY + G 1000 repeticiones.....	17

## **RESUMEN**

El virus de la influenza A humana (IAV) ha producido gripes estacionales y pandemias a lo largo de la historia de la humanidad. Este virus, no sólo afecta a seres humanos, sino que también a animales produciendo zoonosis y zoonosis reversa. Por su importancia, la evolución de este virus ha sido estudiado de manera continua en el mundo. Sin embargo, en Chile y Sudamérica la información es escasa sobretodo antes de la pandemia del 2009. El objetivo del presente estudio fue estudiar retrospectivamente la dinámica y diversidad viral de IAV humanos chilenos, usando el gen de la hemaglutinina de aislados obtenidos entre los años 1996 y 2007. Se secuenciaron aislados y se analizaron mediante filogenia para evidenciar las relaciones genéticas de los virus nacionales con otros obtenidos a nivel mundial. Se obtuvo 42 genomas de IAV, de las cuales 12 correspondieron al subtipo H1 y 30 al subtipo H3. Los virus correspondieron a los subtipos H1N1 y H3N2, no se identificaron H1N2. Los subtipos H1 fueron detectados en los años 1996 (1) y 2000 (11), y a su vez, los subtipos H3 se encontraron en los años 1996, 2001, 2003, 2004, 2005 y 2007. Los análisis filogenéticos en general demostraron una distribución polifilética de los aislados, compatible con introducciones independientes de virus, los cuales en general estuvieron relacionados con aislados de Norteamérica. Esta dinámica y diversidad viral fue similar a lo observado a nivel mundial.

**Palabras clave:** influenza A humana, filogenia, hemaglutinina

## **ABSTRACT**

The human influenza A virus (IAV) has been causing seasonal flu and Influenza pandemics throughout human history. This virus not only affects humans but also animals producing zoonoses and reverse zoonoses. Due to its importance, the evolution of this virus has been studied continuously worldwide. However, in Chile and South America, information is scarce, especially before the 2009 pandemic. The objective of this study was to study the viral dynamics and diversity of Chilean human IAVs, using the hemagglutinin gene of isolates obtained between 1996. and 2007. Isolates were sequenced and analyzed using phylogeny to demonstrate the genetic relationships of Chilean viruses with others obtained worldwide. Forty-two IAV genomes were obtained, of which 12 were subtyped as H1 and 30 as H3 subtype. All viruses detected corresponded to the H1N1 and H3N2 subtypes, H1N2 was not identified. The H1 subtype was detected in 1996 (1) and 2000 (11), and the H3 subtype was detected in 1996, 2001, 2003, 2004, 2005, and 2007. In general, the phylogeny showed a distribution polyphyletic of the isolates. These results are compatible with independent introductions of viruses, which in general were close related to isolates from North America. This dynamic and viral diversity was similar to the global seasonal influenza dynamic.

**Key words:** human influenza A, phylogeny, hemagglutinin.

## **INTRODUCCIÓN**

El virus influenza A (IAV), causante de la Influenza o Gripe, es una de las principales amenazas hacia la salud pública, ya que tiene una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Es responsable de gripes estacionales en la humanidad desde tiempos remotos, y ha tenido participación en pandemias catastróficas produciendo millones de muertes a través de la historia. Sin embargo, este virus no está presente solo en humanos, sino que también afecta otras especies como cerdos y aves, produciendo zoonosis (animal-humano) y zoonosis reversa (humano-animal). Para esto, el virus utiliza mecanismos genéticos como la deriva antigénica (antigenic drift) o el reordenamiento genético (antigenic shift) siendo una ventaja para infectar a diferentes especies, además, estas características le permiten al virus evadir el sistema inmune de sus hospederos.

El IAV se clasifica por subtipos que pueden, a su vez, tener múltiples linajes genéticos y antigénicamente distintos. Estos subtipos se determinan de acuerdo con las características antigénicas de dos proteínas; hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). En general en humanos los subtipos presentes son H1N1, H1N2 y H3N2, y pueden aislarse desde eventos de gripe estacional.

A pesar de que existe mucha información a nivel mundial de los linajes de IAV en humanos, la información en Chile es exigua antes de la pandemia del 2009. Antes de esa fecha solo existen escasas secuencias de los genes HA y NA, por lo cual no se conoce la diversidad viral previo a la última pandemia. Esta falta de información a nivel nacional trasciende las fronteras abarcando toda Sudamérica, pudiendo ser considerada una gran limitante para entender el comportamiento viral en esas zonas.

En este estudio, se propone como objetivo el conocer la diversidad genética del gen de la HA en humanos chilenos previo a la pandemia 2009, donde se analizarán muestras de los años 1996 al 2007, con el objetivo de investigar el comportamiento viral y determinar si evolucionó de manera aislada o concorde a otras partes del mundo.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Información general de los virus influenza A

El IAV es una de las principales amenazas hacia la salud pública, generando altas tasas de morbilidad y mortalidad cada año (Pleschka, 2013). El IAV es endémico en humanos, así también como en cerdos y aves, especialmente acuáticas; las que son el reservorio natural de este patógeno (Brown, 2013). Adicionalmente, muchas especies animales son susceptibles a IAV, tales como las aves de corral (Alexander y Capua, 2008; Corzo *et al.*, 2012), equinos (Murcia *et al.*, 2010), gatos (Ali *et al.*, 2011), perros (Hoelzer *et al.*, 2010), algunas especies de mamíferos marinos (Harder *et al.*, 2013), murciélagos (Tong *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013) entre otros. Es así como el virus puede causar enormes pérdidas económicas, tanto en la salud pública como en algunas especies de abasto; aves de corral y porcinos. Debido a que las aves acuáticas son el reservorio natural de IAV, y a la amplia gama de hospedadores susceptibles, el virus no puede ser erradicado (Palese y Shaw, 2013; Wright *et al.*, 2013). Además, debido a su alto grado de mutación lo transforma en un desafío anual para los sistemas sanitarios, que deben generar una vacuna eficaz para la gripe estacional humana (Ortiz y Tamañes, 2015).

El IAV es miembro de la familia *Orthomyxoviridae*, que contempla virus que tienen un genoma ARN segmentado de hebra simple de polaridad negativa (Wright *et al.*, 2013). Posee un genoma dividido en 8 segmentos virales, correspondientes a PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, y NS, los cuales codifican hasta 12 proteínas virales (Mugosa *et al.*, 2016; Palese y Shaw, 2013). Las glicoproteínas de superficie viral hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA) son las principales proteínas antigénicas, las cuales juegan un rol importante en la inducción de la respuesta inmune en el hospedador (Wright *et al.*, 2013). Es así, como el IAV está caracterizado en subtipos basándose en las propiedades de dichas proteínas, donde HA ha sido clasificada en 18 subtipos (H1-H18) y NA en 11 subtipos (N1-N11), hasta la fecha (Tong *et al.*, 2013).

Su genoma, de naturaleza segmentada, permite mutaciones que producen una rápida evolución del virus, cambiando sus propiedades antigénicas como objetivo de evadir el sistema inmune del hospedero (Wright *et al.*, 2013). Estos procesos producen cambios genómicos en los segmentos virales, permitiendo reinfectar y producir enfermedad en más de una especie (Hensley *et al.*, 2009). Estos cambios pueden ser pequeños o mayores; el denominado “*antigenic drift*” o deriva antigénica, refiere a mutaciones menores y graduales en el genoma que codifican las proteínas HA y NA (Gamblin y Skehel, 2010; Wright *et al.*, 2013), mientras que el denominado “*antigenic shift*”, es una mutación que logra un cambio abrupto y relevante en los mismos segmentos virales, logrando que éste sea antigénicamente distinto al virus circulante (De La Pava, 2010; Wright *et al.*, 2013). Los cambios pueden suceder cuando las células son infectadas con dos o más IAV, generando un agente diferente del punto de vista inmunológico, ya que se mezclaron segmentos de diferentes subtipos. Debido a esto, hay probabilidades que la población no esté anteriormente inmunizada, lo cual aumenta el riesgo de una pandemia producida por el virus (Taubenberger y Kash, 2010). Además, todos los cambios genéticos dificultan la producción de nuevas vacunas eficientes contra el virus (Bedford *et al.*, 2014; Thacker y Janke, 2008).

### **Proteína hemaglutinina**

La proteína HA es el principal componente antigénico del virus, dentro de sus funciones está la entrada del virus en la célula huésped (Wright *et al.*, 2013). Aunque el gen de la NA también puede presentar cambios antigénicos, se ha reportado que mutaciones puntuales en un sitio antigénico de HA puede ser suficiente para la variación antigénica (Mugosa *et al.*, 2016).

### **Historia de los virus influenza A en humanos**

El IAV humano es conocido de tiempos remotos siendo uno de los responsables de la gripe estacional anual (Medina y García-Sastre, 2011). Este virus puede mutar y producir pandemias en la población no inmunizada, como ocurrió en 1918 donde la denominada

“gripe española” fue responsable de la muerte de más de 50 millones de personas (Osores *et al.*, 2009; Mugosa *et al.*, 2016). El agente responsable del evento fue un subtipo H1N1, que hasta el día de hoy es de procedencia desconocida; se ha sugerido un origen humano y aviar (Worobey *et al.*, 2014), mientras que otros lo atribuyen a un origen porcino (Humphreys, 2018). Luego de la pandemia, se establecieron dos linajes independientes; uno de humanos (linaje H1N1 estacional humano) y otro de cerdos (linaje H1N1 porcino clásico) (Wright *et al.*, 2013). El segundo evento pandémico se originó en China, en el año 1957 denominada “gripe asiática”, donde se aportó los genes NA, HA y PB1 de origen aviar a la influenza circulante de 1918 (se conservaron los otros 5 genes), creando el subtipo H2N2 (Gong *et al.*, 2018; Wright *et al.*, 2013), el cual generó aproximadamente 4 millones de muertes en todo el mundo (Osores *et al.*, 2009). El gen H2 es muy poco tolerante a mutaciones y desapareció 11 años después de surgido (Linster, *et al.*, 2019). Posteriormente, en el año 1968 hubo un nuevo reordenamiento genético del virus que integró nuevamente características de la influenza aviar, describiéndose el aporte de dos genes; HA y PB1, formando el nuevo subtipo H3N2 en humanos, que fue el principal IAV hasta el año 2009 (Medina y García-Sastre, 2011; Wright *et al.*, 2013). Este nuevo linaje, fue aislado en humanos por primera vez en Asia donde posteriormente se propagó por el mundo, desatando la tercera pandemia llamada “gripe de Hong Kong” (Krause *et al.*, 2012).

El IAV H3N2, ahora estacional, junto con H1N1, también estacional, y su variante reordenada H1N2, circulan hasta la actualidad produciendo gripes todos los años (Krause *et al.*, 2012; Medina y García-Sastre, 2011). Posterior a la influenza de Hong Kong, en el año 1977 un nuevo linaje humano de H1N1 aparece produciendo gripes estacionales (Osores *et al.*, 2009). Luego, en el año 1997 se describe la primera gripe en humanos que tuvieron contacto directo con aves domésticas en Hong Kong, siendo subtipo H5N1 de origen aviar (Medina y García-Sastre, 2011). Posterior a esto, hubo cambios genéticos en IAV pero que no generaron gran impacto en la salud pública hasta el año 2009, año en que se describe una nueva pandemia debido a una cepa H1N1 de origen porcino, inusual en humanos (Wright *et al.*, 2013). Los primeros casos fueron descritos en EEUU y México, donde en

pocas semanas se propagó por todo el mundo, que afectó un total de 214 países y causó más de 18.000 muertes (Medina y García-Sastre, 2011 y Mugosa *et al.*, 2016). Según Medina y García-Sastre, 2011, el H1N1 descrito sería antigénicamente similar al H1N1 de 1918 (IAV porcina clásica). La nueva cepa de virus H1N1 se generó en consecuencia de un triple reordenamiento genético que involucró IAV humano, aviar y porcino (Mugosa *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2014). Los genes aportados al IAV pandémico del 2009 corresponden a PB2 y PA aviar de América del Norte, PB1 de H3N2 humano, HA (subtipo H1), NP, NS del virus porcino clásico y NA (subtipo N1) y M del virus porcino Eurásico (Medina y García-Sastre, 2011). Pese a lo anterior, la Organización Mundial de la Salud aun considera con mayor potencial de nueva pandemia a los subtipos H7, H5 y H9 de origen aviar (Tretyakova *et al.*, 2013).

### **Situación nacional**

Hoy en día, existe mucha información de cómo ha mutado IAV de origen humano a nivel global posterior a la pandemia del 2009. Sin embargo, los datos existentes en Chile y así como en el mundo previo al 2009 son muy pocos. A la fecha solo existen 13 aislados chilenos secuenciados entre los años 1996 y 2007. Todas han sido secuenciadas para su gen HA, pero solo 4 tienen genoma completo.

### **Justificación del estudio**

Las pandemias y gripes estacionales que afectan a la especie humana son producidas por las variaciones antigénicas que tienen las proteínas HA y NA, esto recalca la importancia de su estudio y tipificación permanente. Al existir pocas secuencias de IAV chilenas en la base de datos entre los años 1996 y 2007, es una incógnita su comportamiento viral y su origen.

Por otro lado, al ser un virus de carácter zoonótico reverso, su estudio genético cobra gran relevancia en la investigación veterinaria. Esto es debido a su capacidad de infectar de humanos a especies de abasto, como es en el caso de los porcinos.

## **HIPÓTESIS**

Los subtipos H3 y H1 del virus de Influenza A humana en Chile entre los años 1996 y 2007, tendrá múltiples introducciones genéticas y su distribución se asimilará a la circulación global del virus de acuerdo al año en el que estuvieron circulando.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar variabilidad genética del gen HA en subtipos y su filogenia entre los años 1996 y 2007.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Describir variabilidad genética en subtipos del gen HA de acuerdo a los años de obtención.
- b. Describir la filogenia de las secuencias chilenas de acuerdo con los años de obtención.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio**

Para determinar la variabilidad genética de IAV de origen humano de acuerdo con subtipo entre los años 1996-2007 se analizarán 57 aislados virales obtenidos desde pacientes humanos (pacientes ambulatorios o con neumonía aguda). Estos aislados fueron proporcionados por el Dr. Gonzalo Barriga del Laboratorio de Virus Emergentes de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, correspondientes a muestras que en su momento fueron aisladas y confirmadas positivas a IAV mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Para secuenciar los virus se debe hacer un diagnóstico y tener una carga viral mínima, por lo cual se propagaron y posteriormente se reconfirmó su presencia mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real (rtRT-PCR) en el Laboratorio de Virología Animal del Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El detalle de estos procedimientos se encuentra en Anexo 2. Una vez confirmadas las cepas, estas fueron sometidas al protocolo de secuenciación, que consiste en una amplificación total del genoma y posterior secuenciación con la técnica de Illumina.

### **Secuenciación del genoma**

La amplificación del genoma completo fue desarrollada por el método de RT-PCR multisegmento. El ARN extraído desde cada muestra positiva fue usado como templado para sintetizar el ADN complementario (ADNc) utilizando los partidores MBTuni-12 y MBtuni13, y el kit Superscript III First Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, el producto del RT-PCR fue purificado utilizando el kit comercial QIAquick Spin Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los productos purificados fueron enviados para la preparación de la biblioteca y finalmente la secuenciación fue realizada usando la tecnología Illumina HiSeq2000 (250 nt paired run)

en el Center for Research on Influenza Pathogenesis (CRIP) en Icahn School of Medicine at Mount Sinai, NY, USA. Este procedimiento garantiza la cobertura de >1000x de cada nucleótido (hasta 45.000x), lo cual permite el ensamblaje “*de novo*” el cual también es desarrollado por Mount Sinaí. El resultado de la secuenciación corresponde al genoma completo de los virus. Sin embargo, esta tesis se enfoca solamente en analizar el segmento 4 correspondiente al gen de la Hemaglutinina, ya que corresponde al gen más variable y que nos permite conocer la variabilidad general del virus. Cabe destacar que los procedimientos de amplificación del genoma fueron realizados por el Laboratorio de Virología Molecular, Pontificia Universidad Católica a cargo del Dr. Rafael Medina.

### **Análisis filogenético**

El análisis filogenético fue realizado con el programa MEGA ® 7.0. Las secuencias del gen HA fueron clasificadas de acuerdo a subtipo en H1 o H3. Por defecto los subtipos vienen identificados por lo cual no es necesaria su evaluación. Primero que todo, se realizó alineamientos de nucleótidos de las secuencias del estudio para los subtipos H1 y H3 independientemente, con el propósito de realizar una comparación adecuada entre secuencias y así calcular las distancias genéticas para la obtención de árboles filogenéticos. Para ello, se utilizó algoritmo MUSCLE integrado en el programa MEGA ® 7.0.

En segundo lugar se realizó árboles exploratorios para H1 y H3 utilizando el método Neighbor Joining (NJ) con 100 repeticiones. Generados los árboles, se eligieron secuencias representativas de cada uno de los clados de este, para así incorporar mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) secuencias de referencia mundial que sean 98% o más similares a la secuencia elegida con el fin de dar consistencia al árbol final. También se incluyeron otras secuencias de origen chileno que previamente han sido publicadas. Para esto se exploró las plataformas de GenBank y GISAID.

Posteriormente, se agregaron secuencias de origen mundial sin criterio de similitud. Se seleccionaron dos secuencias por continente, por año (desde 1996 al 2007), para así poder determinar de mejor manera la dinámica viral de IAV en Chile y definir si hay una o

múltiples introducciones del virus en los años descritos. Después de la obtención del set final de secuencias, se realizó nuevamente un alineamiento en MUSCLE.

Luego se determinó el modelo que tuviera el mejor ajuste de sustitución de nucleótidos con el programa JmodelTest integrado en MEGA ®, para así no asumir una tasa de mutación homogénea y así evitar árboles homoplásicos.

La construcción de árboles finales se realizó con el método estadístico de Máxima Verosimilitud, con un bootstrap de 1000 repeticiones. La visualización y edición de los árboles se realizó con el programa FigTree ®.

Un resumen de las actividades incorporadas en la tesis puede observarse en la Figura 1.

### **Análisis estadístico**

Por la naturaleza de sus datos, no se puede generar un análisis estadístico clásico de los resultados. Sin embargo, los métodos para lograr el análisis filogenético incluyen estadísticas, que corresponden a una representación hipotética de distancias genéticas entre secuencias con un antepasado en común. En este caso, se analizan de manera automática en el programa MEGA ®.

### **Bioseguridad**

El presente proyecto ha sido certificado para poder realizarlo de acuerdo con el Comité de Bioseguridad de FAVET (Anexo 1).

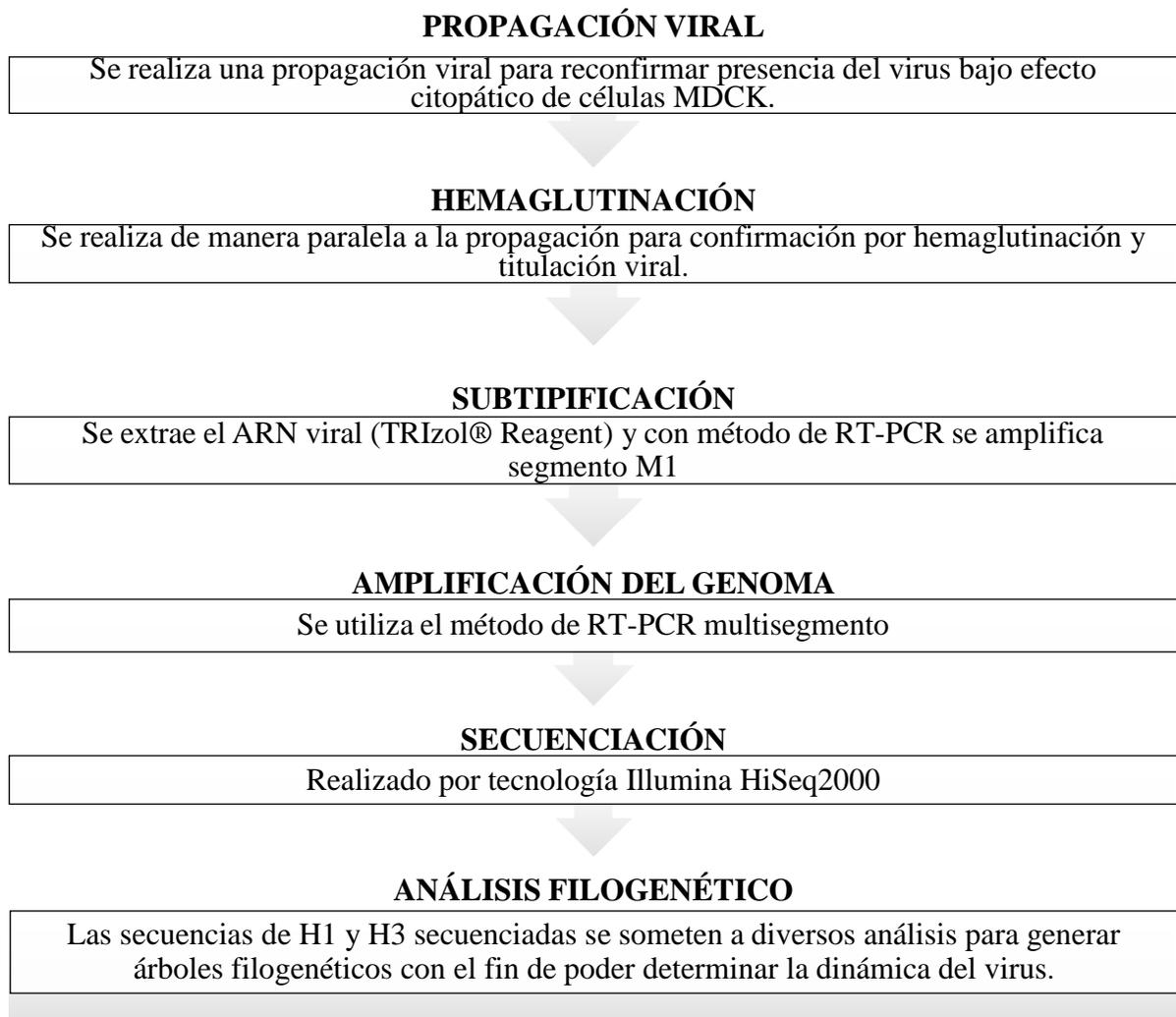
El Laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile cuenta con los requisitos descritos por la OIE para trabajar con el virus de influenza A, el cual necesita un laboratorio de bioseguridad tipo 2 (Clavel y Grimaldo, 1998).

El laboratorio cuenta con los implementos necesarios, como gabinetes de bioseguridad clase 2 certificado para agentes que puedan producir aerosoles, capacitación del personal a cargo de un jefe de laboratorio, autoclave, lavabo, lugares aptos para la eliminación de

material corto punzante y con restos orgánicos, acceso limitado de personas ajenas mientras se trabaja con el agente.

Además para la realización de este trabajo se manipularán solo muestras de origen humano, el cual tiene una patogenicidad menor a cepas de otras especies.

Este proyecto se desarrolla en el marco de Fondecyt de Iniciación 11170877, y es parte de un proyecto de doctorado contando con el respaldo técnico del CEIRS e ICBM.



**Figura 1.** Esquema resumen de las actividades realizadas en el estudio

## RESULTADOS

### Resultados generales del diagnóstico

Del total de los 57 aislados, fue posible propagar y confirmar 42 de ellos, los cuales fueron secuenciados exitosamente. Las secuencias actualmente se encuentran depositadas en las plataformas Genbank y GISAID. De los 42 genomas obtenidos, se utilizaron los genes de la hemaglutinina, de las cuales 12 correspondieron al subtipo H1 y 30 al subtipo H3. Los virus correspondieron a los subtipos H1N1 y H3N2, no se identificaron H1N2.

Los aislados del subtipo H1 fueron detectados en los años 1996 (1) y 2000 (11), y a su vez, los aislados de H3 se encontraron en los años 1996, 2001, 2003, 2004, 2005 y 2007. Ambos subtipos fueron analizados de manera independiente.

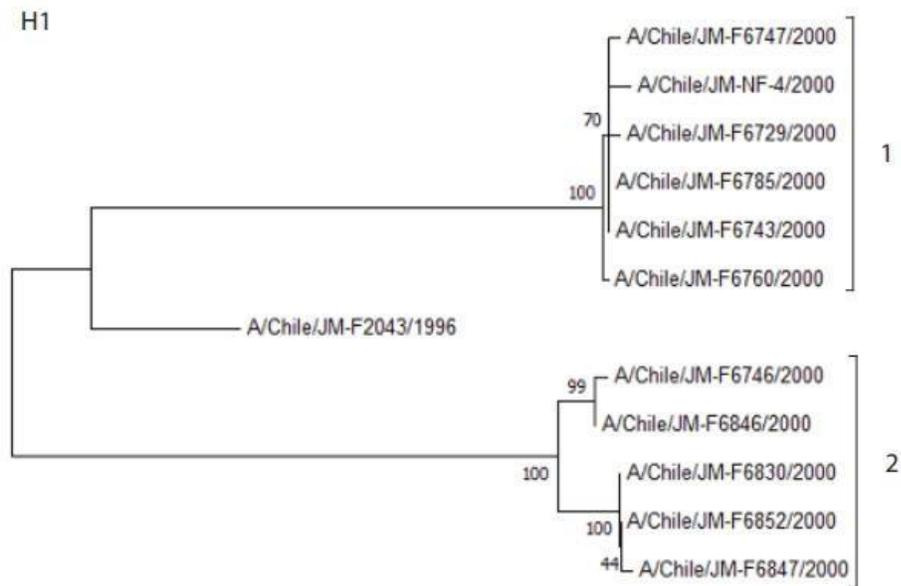
**Tabla 1.** Resumen de subtipos HA identificados en el estudio según año.

<b>Año</b>	<b>Aislados</b>	<b>H1</b>	<b>H3</b>
<b>1996</b>	12	1	11
<b>2000</b>	11	11	0
<b>2001</b>	8	0	8
<b>2003</b>	2	0	2
<b>2004</b>	5	0	5
<b>2005</b>	3	0	3
<b>2007</b>	1	0	1
<b>Total</b>	42	12	30

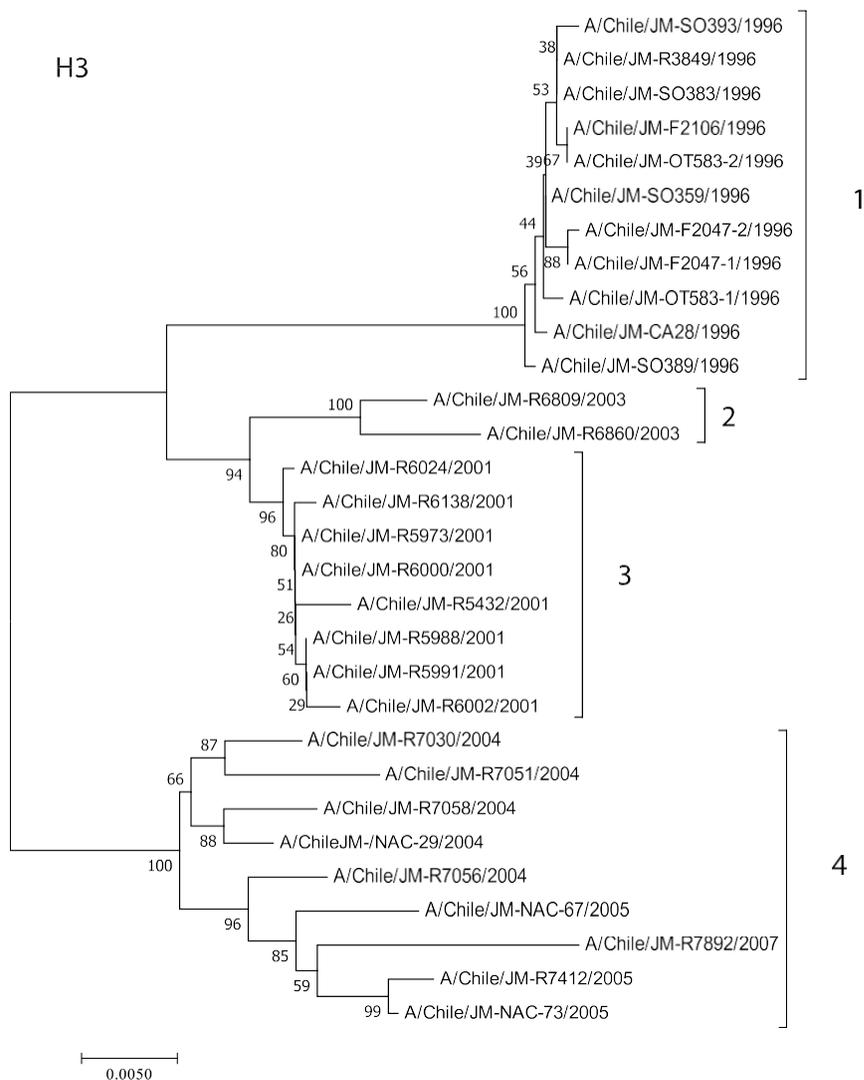
## Análisis exploratorio preliminar

Las 12 secuencias de H1 y las 30 de H3 fueron alineadas independientemente. Los árboles básicos exploratorios de Neighbor-Joining con 100 repeticiones son visualizados en las figuras 2 y 3.

En la filogenia de H1 se observaron dos clados que agrupan todas las secuencias obtenidas del año 2000 (clado 1 y 2), mientras que la secuencia de 1996 se observa como un singleton. Por otra parte, en el árbol preliminar de H3 se observa que las secuencias se agrupan en 4 clusters. Destaca los clados que presentan solo secuencias del año 1996, 2001, 2003, mientras que el último agrupó secuencias de los años 2004, 2005 y 2007.



**Figura 2.** Árbol filogenético exploratorio H1. Se utilizó el método Neighbor-Joining con 100 repeticiones. Se puede ver predominio de dos clados principales, ambos agrupan virus del año 2000.



**Figura 3.** Árbol filogenético exploratorio H3. Se utilizó el método Neighbor-Joining con 100 repeticiones. Se puede observar la presencia de cuatro clados principales.

#### Adición de secuencias

Posterior a la obtención de árboles preliminares, se eligió secuencias representativas de acuerdo al criterio expuesto previamente. El total de secuencias incorporadas para la realización de árboles se puede ver en la tabla 2. Brevemente, el set de datos final incorporó

146 secuencias de H1 y 223 secuencias de H3. El modelo de sustitución determinado fue HKY + G para ambos subtipos.

**Tabla 2.** Número de secuencias obtenidas para el gen HA subtipo H3 y H1 del estudio, chilenas y mundiales.

<b>Subtipo</b>	<b>H1</b>	<b>H3</b>
Estudio	12	30
Chilenas	9	24
Mundiales BLAST	53	69
Mundiales	72	100
Total	146	223

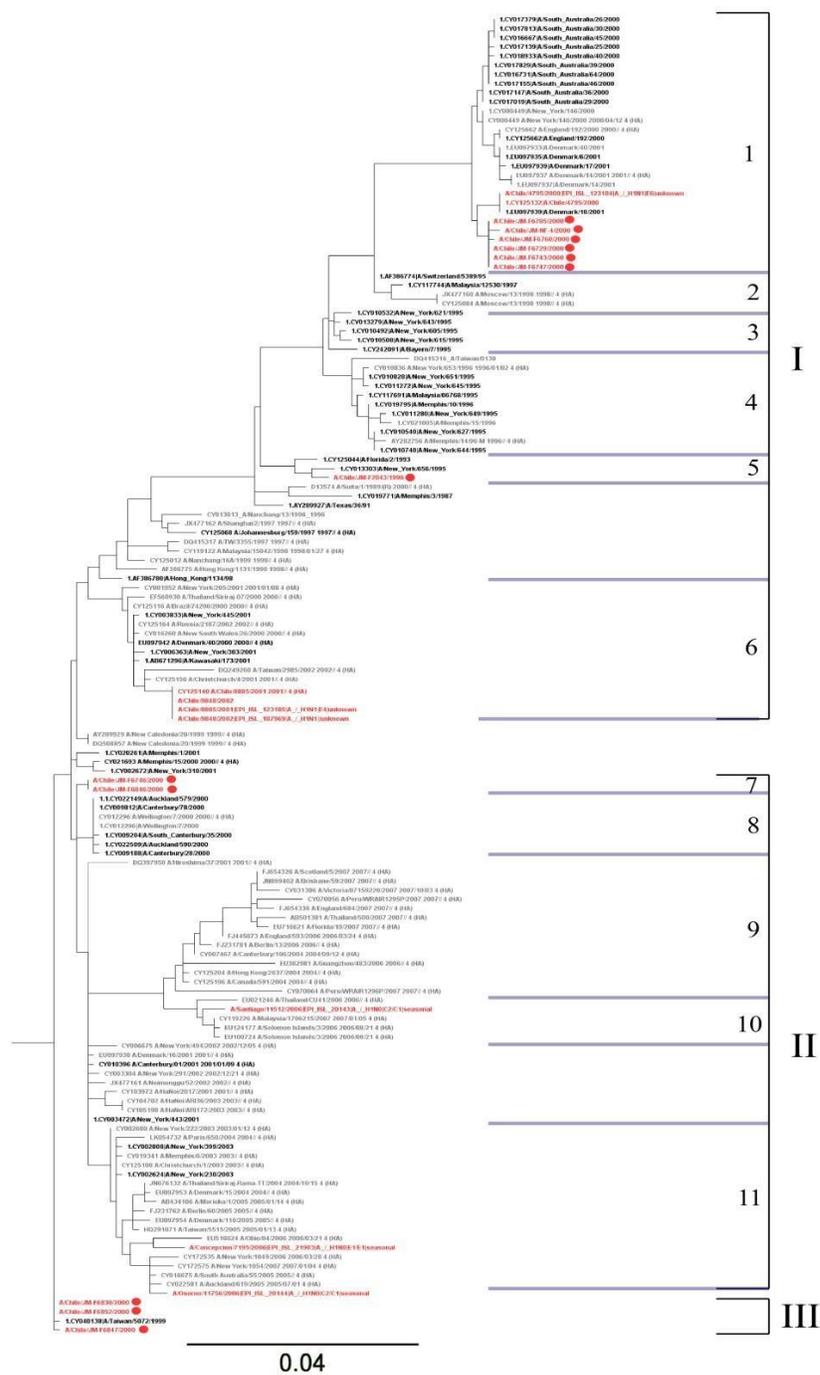
## **Filogenias finales**

### **Árbol final H1**

El árbol final de H1 (figura 4) fue realizado con un total de 146 secuencias. Cabe destacar que de las secuencias chilenas obtenidas de GISAID, cinco eran secuencias incompletas y cuatro completas. El set de datos final fue alineado, y el modelo de sustitución más adecuado para hacer el análisis fue HKY + G. Se describen tres clados (I,II y III) y 11 subclados.

En primer lugar se puede observar que la secuencia H1 del estudio perteneciente al año 1996 (singleton en el árbol preliminar), se ubica en el clado I subclado 5 y se encuentra relacionada filogenéticamente con NewYork/656/1995 y Florida/2/1993.

Respecto a las secuencias de los 2000's algunas de ellas se encuentran agrupadas en el clado I subclado 1, manteniendo la estructura observada en los árboles preliminares, con secuencias cercanas de Oceanía, Norteamérica y Europa del mismo año. Por otro lado, las secuencias del segundo clado preliminar se encuentran en el clado III y clado II subclado siete.



**Figura 4.** Árbol Filogenético H1 HKY + G 1000 repeticiones. En rojo con punto las secuencias chilenas, en rojo chilenas de repositorios públicos, en gris secuencias mundiales sin criterio de similitud, negro secuencias agregadas con método BLAST. Clados I, II y III delimitados con corcheas negras, línea azul delimita subclados (del 1 al 11).

Las secuencias de los años 2001 y 2002 se encuentran en el clado I subclado 6, relacionadas con secuencias de Oceanía, Asia y Europa de los mismos años. Ambas tienen una distribución monofilética en el mapa.

Por último, las tres secuencias del año 2006 se encuentran en el clado II. La secuencia A/Santiago/11512/2006 se ubica en el subclado 10, relacionado estrechamente con secuencias de Asia y Oceanía de los años 2006 y 2007. Por otro lado, las dos secuencias restantes se ubican en el subclado 11, relacionadas con secuencias de Norteamérica y Oceanía del mismo año.

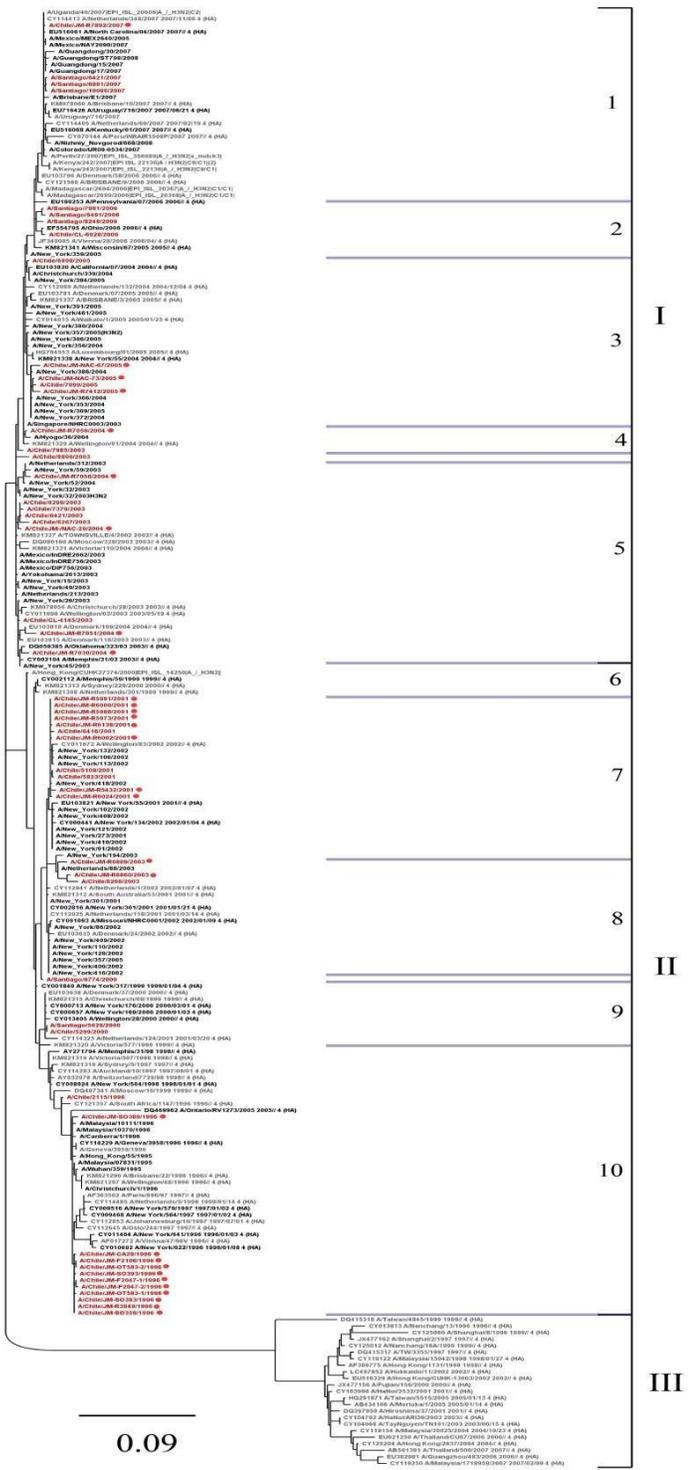
### **Árbol final H3**

El árbol final de H3 (figura 5) fue realizado con un total de 223 secuencias. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud con 1000 repeticiones y un modelo de sustitución HKY + G. Se describieron para su análisis 3 clados y 10 subclados. Destaca el clado III que contiene secuencias exclusivamente de Asia agregadas a la base de datos sin criterio BLAST de los años 1996 al 2007 encontrándose distanciadas y aisladas de los otros dos clados.

En primer lugar, se puede observar que las secuencias del año 1996 se encuentran agrupadas en el clado II, subclado 10. Todas mantienen una distancia muy corta entre sí, a excepción de las secuencias A/Chile/2115/1996 y A/Chile/JM-SO389/1996 que se encuentran separadas del grupo por secuencias de Asia, Oceanía y Europa de los años 1996 y 1997.

De los años 2000's, dos secuencias se sitúan en el clado II subclado 9 relacionadas filogenéticamente con secuencias de Europa, Oceanía y Norteamérica del mismo año. Por otro lado, la secuencia A/Santiago/6774/2000 se encuentra como un singleton entre los subclados 8 y 9.

Para el año 2001, las secuencias se encuentran distribuidas de manera monofilética en el subclado 7, cercanas a secuencias de Oceanía y Norteamérica de los años 2001 y 2002.



**Figura 5.** Árbol Filogenético H3 HKY + G 1000 repeticiones. En rojo con punto las secuencias chilenas, en rojo chilenas de repositorios públicos, en gris secuencias mundiales sin criterio de similitud, negro secuencias agregadas con método BLAST. Clados I, II y III delimitados con corcheas negras, línea azul delimita subclados (del 1 al 10).

El año 2003 destaca una distribución polifilética, encontrándose secuencias en los clados I y II, subclados 5 y 8. Dos secuencias, A/Chile/ 7985/2003 y A/Chile/8806/2003, se encuentran sin secuencias cercanas, comportándose ambas como singleton entre los subclados 4 y 5.

Las secuencias del año 2004 se encuentran en los subclados 4 y 5 del clado I, relacionadas filogenéticamente con secuencias de Asia, Europa del año 2003, 2004 y chilenas del año 2003.

Para el año 2005 se encuentran reunidas en el subclado 3 muy relacionadas con secuencias de Nueva York del mismo año. Destaca la secuencia A/Chile/6898/2005 que se encuentra distanciada del conjunto y cercana a secuencias de Norteamérica de los años 2004 y 2005.

Las secuencias del año 2006 se encuentran distribuidas de manera monofilética en el subclado 2, relacionada con secuencias de Norteamérica y Europa del mismo año.

Finalmente para el 2007, las secuencias se encuentran agrupadas en el subclado 1. Destaca la secuencia A/Chile/JM-R7892/2007 que se encuentra distanciada por secuencias de Norteamérica y Asia de los años 2006 y 2007.

## DISCUSIÓN

El IAV humano ha producido grandes impactos en la salud pública, por lo cual su constante tipificación y definición de su filogenia es importante. A pesar de su gran relevancia, existen pocas secuencias chilenas en los repositorios públicos antes del año 2009 y lo mismo ocurre en muchas zonas templadas, incluyendo Sudamérica, donde las publicaciones e investigaciones son escasas (Bahl *et al*, 2011; Lemey *et al*, 2014).

Los árboles finales de este estudio fueron creados con 146 secuencias del subtipo H1 y 223 secuencias del subtipo H3. El número de muestras encontradas en la base de datos es significativamente menor para H1 respecto a H3, lo que podría explicarse con la predominancia de H3N2 por sobre el subtipo H1H1 desde el año 1968 (Bedford *et al*, 2015; Rambaut *et al*, 2008).

Si bien no existe bibliografía que ahonde la dinámica e introducción de IAV pre pandémicos en países de América del Sur, hay estudios que proponen una migración más directa desde Norteamérica (Bedford *et al*, 2010; Bahl *et al*, 2011). En el presente estudio, se encontraron estrechas relaciones filogenéticas con Estados Unidos y en menor proporción con Asia, Europa y Oceanía, pudiendo asumir una introducción más fuerte desde América del Norte.

La distribución de las secuencias de H1 y H3 chilenas en los mapas las posiciona junto a secuencias de la misma temporada de diferentes partes del mundo, lo cual puede corroborar la hipótesis planteada en este trabajo. Se observa una distribución generalmente polifilética, demostrando múltiples introducciones del virus al país, lo que coincide con estudios sobre dinámica de IAV hechos anteriormente en otras partes del mundo (Rambaut *et al*, 2008; Bahl *et al*, 2011).

Profundizando el análisis de los árboles finales, el posicionamiento de las secuencias chilenas asume una distribución monofilética en los años 2001 y 2002 para H1, y para H3 en los años 2001, 2002, 2006 y 2007. Sin embargo, el número de muestras para dichos años es pequeño, asumiendo una distribución y/o introducción única producto de la escasa información. También es importante destacar que las secuencias de estos años no describen

el lugar de obtención de estas, pudiendo ser muestras de una sola zona geográfica, lo cual podría explicar la cercanía y similitud genética que los posicionó dentro del mismo subclado. No obstante, las secuencias de los años 2000 y 2006 para el subtipo H1, y de los años 1996, 2000, 2003, 2004 y 2005 para el subtipo H3, contienen un set de muestras más grandes y presentan una distribución polifilética en el mapa. Este tipo de distribución en el mapa puede reflejar múltiples introducciones del virus, lo cual se asimila a la red de transmisión global de IAV descrito en la bibliografía (Bedford *et al*, 2010; Russel *et al*, 2008).

La mayoría de las secuencias chilenas del año 1996 del subtipo H3 se encuentran en un mismo subclado, exceptuando por A/Chile/JM-SO389/1996 y A/Chile/2115/1996 que se distancian de las demás. Esto podría estar dado por dos fenómenos; el primero, que la muestras hayan sido tomadas en diferentes zonas de país, o segundo, que el método de secuenciación de Sanger utilizado en esos años haya determinado mayor distancia entre sus secuencias por tener más de 1000 nucleótidos que analizar, disminuyendo así la confianza de los resultados (Garrigues, 2017).

En el árbol final de H3 destaca un clado (clado III) que contiene todas las secuencias asiáticas incorporadas con el criterio de año y continente. Los taxas que lo conforman se caracterizan por presentar gaps en las mismas posiciones que, aunque se realizó un alineamiento metódico, seguían presentes y podría explicar la distancia genética que el programa calculó. Según la bibliografía, el tronco principal del subtipo H3N2 es China y el sudeste asiático (Bahl *et al*, 2011; Bedford *et al*, 2015; Lemey *et al*, 2014), por lo cual esperábamos que sus secuencias estuvieran integradas junto a todas las demás y más cercanas al nodo raíz y no como un clado independiente.

## **CONCLUSIÓN**

Chile es un país que se caracteriza por estar aislado gracias a su frontera natural. Considerando las características geográficas del territorio nacional y el limitado número de muestras del virus entre los años 1996 – 2007, la dinámica viral no fue diferente a la demostrada mundialmente. En general, se demostró múltiples introducciones del virus al país, que estaban genéticamente relacionadas a secuencias de origen mundial de los mismos años, sobretodo de América del Norte, lo cual era esperado según la escasa bibliografía existente al respecto.

El constante monitoreo, tipificación y análisis de los virus que producen un gran impacto en la salud pública como lo es IAV humano, es muy importante para entender su comportamiento viral a través de los años, sus mutaciones y facilitar así la creación de vacunas. Además, por su evidente potencial pandémico y capacidad de producir zoonosis y zoonosis reversa, el estudio retrospectivo en diferentes especies cobra mayor relevancia, sobre todo en países con información limitada, convirtiéndose así en un desafío para la investigación local de los países de Latinoamérica, África y zonas templadas del mundo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ALEXANDER, DJ.; CAPUA, I. 2008.** Avian influenza in poultry. *Worlds Poultry Science Journal*. 64:513-531.

**ALI, A.; DANIELS, JB.; ZHANG, Y.; RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; HAYES-OZELLO, K.; MATHES, L.; LEE, CW. 2011.** Pandemic and Seasonal Human Influenza Virus Infections in Domestic Cats: Prevalence, Association with Respiratory Disease, and Seasonality Patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 4101-4105.

**BAHL, J; NELSON, M.; CHAN, K.; CHEN, R.; VIJAYKRISHNA, D.; HALPIN, R.; STOCKWELL, T.; LIN, X.; WENTWORTH, D.; GHEDIN, E.; GUAN, Y.; MALIK, J.; RILEY, S.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E.; SMITH, G. 2011.** Temporally structured metapopulation dynamics and persistence of influenza A H3N2 virus in humans. *PNAS*. 108 (48): 19359-64.

**BEDFORD, T.; COBEY, S.; BEERLI, P.; PASCUAL, M. 2010.** Global Migration Dynamics Underlie Evolution and Persistence of Human Influenza A (H3N2). 6 (5): 1 – 10. En [línea.](https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000918) <  
<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000918>>  
[consulta: 07-07-2021]

**BEDFORD, T.; RILEY, S.; BARR, I.; BROOR, S.; CHADHA, M.; COX, N.; DANIELS, R.; PALANI, C.; HURT, A.; KELSO, A.; KLIMOV, A.; LEWIS, N.; LI, X.; MACCAULEY, J.; ODAGIRI, T.; POTDAR, V.; RAMBAUT, A.; SHU, Y.; SKEPNER, E.; SMITH, D.; SUCHARD, M.; TASHIRO, M.; WANG, D.; XU, X.; LEMEY, P.; RUSSELL, C. 2015.** Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature*. 523(7559): 217-220.

**BEDFORD, T.; SUCHARD, M.; LEMEY, P.; DUDAS, G.; GREGORY, V.; HAY, A.; MACCAULEY, J.; RUSSEL, C.; SMITH, D. 2014.** Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife*. 3 (01914): 11 - 26 [en línea].

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3909918/pdf/elif01914.pdf>> [consulta: 03-04-2019]

**BROWN I.** 2013. History and Epidemiology of Swine Influenza in Europe. *Swine Influenza*. 370: 133-146.

**CLAVEL, F.; GRIMALDO, M.** 1998. Bioseguridad en los laboratorios. Conf. OIE 1998

**CORZO, C.; GRAMER, M.; LAUER, D.; DAVIES, P.** 2012. Prevalence and Risk Factors for H1N1 and H3N2 Influenza A Virus Infections in Minnesota Turkey Premises. *Avian Diseases*. 56:488-493.

**DE LA PAVA, E.** 2010. Modelado matemático de la transmisión de la gripe AH1N1. *Matemáticas: Enseñanza Universitaria* 3: 2-3.

**GAMBLIN, S.; SKEHEL, J.** 2010. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*. 285(37): 28403–28409.

**GARRIGUES, F.** 2017. Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación. Genotipia. [En línea]. < <https://genotipia.com/sanger/>>

**GONG, Y.; KUO, G.; SHIH, S.** 2018. Centennial review of influenza in Taiwan. *Biomed J*. 41(4): 234-241.

**HARDER, T.; SIEBERT, U.; WOHLSEIN, P.; VAHLENKAMP, T.** 2013. Influenza A virus infections in marine mammals and terrestrial carnivores. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 126:500-508.

**HENSLEY, S.; DAS, S.; BAILEY, A.; SCHMIDT, L.; HICKMAN, H.; JAYARAMAN, A.; VISWANATHAN, K.; RAMAN, R.; SASISEKHARAN, R.**

**BENNINK, J.; YEWDELL, J.** 2009. Hemagglutinin Receptor Binding Avidity Drives Influenza A Virus Antigenic Drift. *Science*. 326 (5953): 734-736.

**HOELZER, K.; MURCIA, PR.; BAILLIE, G.; WOOD, J.; METZGER, S.; OSTERRIEDER, N.; DUBOVI EJ; HOLMES, E.; PARRISH, C.** 2010. Intrahost Evolutionary Dynamics of Canine Influenza Virus in Naive and Partially Immune Dogs. *Journal of Virology*. 84: 5329-5335.

**HUMPHREYS, M.** 2018. The influenza of 1918. Evolutionary perspectives in a historical context. *Evol Med Public Health*. 1: 219-229.

**KRAUSE, J.; TSIBANE, T.; TUMPEY, T.; HUFFMAN, C.; ALBRECHT, R.; BLUM, D.; RAMOS, I.; FERNANDEZ-SESMA, A.; EDWARDS, K.; GARCIA-SASTRE, A. BASLER, C.; CROWE, J.** 2012. Human Monoclonal Antibodies to Pandemic 1957 H2N2 and Pandemic 1968 H3N2 Influenza Viruses. *Journal of Virology*. 86 (11)

**LEMEY, P.; RAMBAUT, T.; BEDFORD, T.; FARIA, N.; BIELEJEC, F.; BAELE, G.; RUSSELL, C.; SMITH, D.; PYBUS, O.; BROCKMANN, D.; SUCHARD, M.** 2014. Unifying Viral Genetics and Human Transportation Data to Predict the Global Transmission Dynamics of Human Influenza H3N2. *Plos Pathogens*. 10(2): e1003932. [En línea]. <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003932> [consulta: 06-07-2021]

**LINSTER, M.; SCHRAUWEN, E.; VAN DER VLIET, S.; BURKE, D.; LEXMOND, P.; BESTEBROER, T.; SMITH, D.; HERFST, B.; KOEL, B.; FOUCHIER, R.** 2019. The Molecular Basis for Antigenic Drift of Human A/H2N2 Influenza Viruses. *Journal of Virology*. 3;93(8):e01907-18. [En línea]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30700609>> [consulta: 15-04-2019]

**MEDINA, R.; GARCÍA-SASTRE, A.** 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nature reviews*. 9: 590-603.

**MUGOSA, B.; VUJOSEVIC, D.; CICCIOZZI, M.; VALLI, M.; CAPOBIANCHI, M.; PRESTI, L.; CELLA, E.; GIOVANETTI, M.; ANGELETTI, S.; SCARPA, F.;**

**TERZIĆ, D.; VRATNICA, Z.** 2016. Genetic diversity of the haemagglutinin (HA) of human influenza A (H1N1) virus in Montenegro: Focus on its origin and evolution. *J Med Virol.* 88(11): 1905- 1913.

**MURCIA, P.; BAILLIE, G.; DALY, J.; ELTON, D.; JERVIS, C.; MUMFORD, J.; NEWTON, R.; PARRISH, C.; HOELZER, K.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J.; LENNARD, N.; ORMOND, D.; MOULE, S.; WHITWHAM, A.; MCCAULEY, J.; MCKINLEY, T.; HOLMES, E.; GRENFELL, B.; WOOD, J.** 2010. Intra- and Interhost Evolutionary Dynamics of Equine Influenza Virus. *Journal of Virology.* 84:6943-6954.

**ORTIZ, R.; TAMANES, S.** 2015. Vacunación antigripal. Efectividad de las vacunas actuales y retos de futuro. *Influenza vaccination. Effectiveness of current vaccines and future challenges.* ScienceDirect. 33 (7): 480 -490.

**OSORES, F.; GÓMEZ, J.; SUAREZ, L.; CABEZAS, C.; ALAVE, J.; MAGIÑA, C.** 2009. Un nuevo virus A/H1N1, una nueva pandemia: Influenza un riesgo permanente para una humanidad globalizada. *Acta méd. peruana.* 26(2): 97-130.

**PALESE, P.; SHAW, M.** 2013. Orthomyxoviridae: the virus and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields—Virology*, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 1647–1689.

**PLESCHKA, S.** 2013. Overview of influenza viruses. In: Richt JA, Webby RJ, editors, *Swine influenza*, Springer Berlin Heidelberg, volume 370 of *Current topics in microbiology and immunology*. pp 1–20.

**RAMBAUT, A.; PYBUS, O.; NELSON, M.; VIBOUD, C.; TAUBENNERGER, J.; HOLMES, E.** 2008. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature.* 29;453(7195):615-9

**RUSSEL, C.; JONES, T.; BARR, I.; COX, N.; GARTEN, R.; GREGORY, V.; GUST, I.; HAMPSON, A.; HAY, A.; HURT, A.; JONG, J.; KELSO, A.; KLIMOV, A.; KAGEYAMA, T.; KOMADINA, N.; LAPEDES, A.; LIN, Y.; MOSTERIN, A.;**

**OBUCHI, N.; ODAGIRI, T.; OSTERHAUS, A.; RIMMELZWAAN, G.; SHAW, M.; SKEPNER, E.; STOHR, K.; TASHIRO, M.; FOUCHIER, R.; SMITH, D.** The Global Circulation of Seasonal Influenza A (H3N2) Viruses. 2008. *Science*. 320: 340 – 345.

**TAUBENBERGER, J.; KASH, J.** 2010. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe*. 25; 7(6):440-51.

**TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; YANG, H.; CHEN, X.; RECUENCO, S.; GOMEZ, J.; CHEN, L.; JOHNSON, A.; TAO, Y.; DREYFUS, C.; YU, W.; MCBRIDE, R.; CARNEY, P.; GILBERT, A.; CHANG, J.; GUO, Z.; DAVIS, C.; PAULSON, J.; STEVENS, J.; RUPPRECHT, C.; HOLMES, E.; WILSON, I.; DONIS, RO.** 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 9(10): e1003657.

**THACKER, E.; JANKE, B.** 2008. Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas. *J Infect Dis*. 2008. 15;197

**TRETYAKOVA, I.; PEARCE, M.; FLORESE, R.; TUMPEY, T.; PUSHKO, P.** 2013. Intranasal vaccination with H5, H7 and H9 hemagglutinins co-localized in a virus-like particle protects ferrets from multiple avian influenza viruses. *Virology*. 442 (1): 67-73.

**VINCENT, A.; AWADA, L.; BROWN, I.; CHEN, H.; CLAES, F.; DAUPHIN, G.** 2014. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses Public Health*. 61(1):4–17.

**WOROBEY, M.; HAN, G.; RAMBAUT, A.** 2014. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11(22): 8107–8112.

**WRIGHT, P.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y.** 2013. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields—virology*, 5th edn. pp 1151 – 1239.

**ZHU, X.; YU, W.; MCBRIDE, R.; LI, Y.; CHEN, L.; DONIS, R.; TONG, S.; PAULSON, J.; WILSON, I.** 2013. Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:1458-1463.

## ANEXOS

### ANEXO 1: CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD



Santiago, 30 septiembre 2019.-

#### CERTIFICADO N° 147

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto **"Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina (HA) del virus influenza A humana en Chile entre los años 1996 y 2007"**, cuyo director es el Dr. Víctor Neira Ramírez, académico del Departamento de Medicina Preventiva Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La evaluación del citado proyecto permite acreditar que las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas Bioseguridad y Riesgos Asociados Fondecyt – CONICYT, versión 2018 y en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)", que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

Se otorga el presente certificado a solicitud del interesado, para los fines que estime conveniente.

  
Dr. José Pizarro Lucero  
Coordinador  
Comité de Bioseguridad  
FAVET – Universidad de Chile



## **ANEXO 2: DIAGNÓSTICO VIRAL**

### **Propagación viral**

Los aislados fueron inoculadas en la línea celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) para propagar los virus. En general, la propagación 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 (MEM) suplementado con 4% de suero fetal bovino y 1% de solución antibiótica y antimicótica, a 37°C y a 5% CO<sub>2</sub> en placas para cultivo celular de 24 pocillos por 24 horas. Una vez que la monocapa celular alcanzó un 80% de confluencia, se lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (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 CO<sub>2</sub> y, después de 1 hora de incubación, se aplicó 1 mL de medio de propagación viral SIV para posteriormente ser incubadas 72 horas a 37° C. Las placas fueron revisadas diariamente con el propósito de detectar efecto citopático, el cual se evidenció microscópicamente 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, 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 indicativa 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. Los aislados fueron re-analizados mediante RT-PCR en tiempo real para la confirmación de la presencia del virus.

## **RT-PCR y subtipificación**

Las muestras procesadas fueron sometidas a un proceso de extracción de ARN viral, mediante el protocolo TRIzol® Reagent (Thermo Fischer Scientific Inc.) de acuerdo con 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 usaron los partidores InfA Forward (5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC -3'), InfA Reverse (5'-AGGGCATTYTGACA AAKCGTCTA -3'), y la sonda InfA Probe (5'-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG -3'). La mezcla maestra consistirá en 1 µL (400 nM) de InfA Forward, 1 µL 9 (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 agregará 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 fue expresado en Ct (cycle threshold) determinado para cada muestra, considerándose positivas las muestras que obtengan un Ct < 35.