

UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS
BIOLÓGICOS
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



**Vigilancia genómica del virus de Influenza Aviar en
muestras de agua ambientales obtenidas en zonas
estratégicas de la ciudad de Antofagasta.**

Informe de Memoria para optar al Título de Biotecnóloga

Francisca Muñoz Olguín

Licenciada en Biotecnología

Dr. Angello Retamal Diaz

Profesor Tutor

Antofagasta

2023

UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS
BIOLÓGICOS
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



**Vigilancia genómica del virus de Influenza Aviar en
muestras de agua ambientales obtenidas en zonas
estratégicas de la ciudad de Antofagasta.**

Informe de Memoria para optar al Título de Biotecnóloga

Francisca Muñoz Olguín

Licenciada en Biotecnología

Dr. Angello Retamal Diaz

Profesor Tutor

Antofagasta

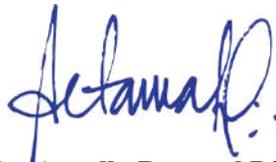
2023

I. Informe de aprobación de memoria de Título

II. Compromiso del Tutor

Antofagasta, 18 de Agosto del 2023

El trabajo de Memoria de Título de la Alumna Francisca Belén Nicole Muñoz Olguín, RUT: 19.967.278-9 ha sido realizado sobre la base del compromiso adquirido desde su práctica profesional y escrito en referencia de sus resultados experimentales de forma íntegra. Se enmarca en la investigación que se lleva a cabo en el Atacama Desert Vaccine Laboratory (ADVaLab) del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos (FACIMAR) de la Universidad de Antofagasta.



Dr. Angello Retamal Diaz

Académico-Investigador

Atacama Desert Vaccine Laboratory

Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia

FOCIS Center of Excellence (FCE)

Departamento de Biotecnología

Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos

Universidad de Antofagasta

Av. Universidad de Antofagasta 02800, Antofagasta

Fono: +569 9509 5514

III. Descripción de la institución donde realizó la actividad de titulación

Esta actividad de titulación se llevó a cabo en la Universidad de Antofagasta, fundada el 20 de marzo de 1981. La universidad de Antofagasta es de carácter público y forma parte del Consejo de Rectores de las Universidad Chilenas, Agrupación de Universidades Regionales de Chile y también del Consorcio de Universidades Estatales de Chile.

Actualmente la Universidad de Antofagasta se encuentra acreditada por la comisión nacional de acreditación, desde septiembre del 2022 hasta septiembre del 2027. Esta casa de estudios se sitúa actualmente en la posición 25 dentro de las universidades chilenas según la clasificación webométrica SCImago Institutions Rankings (SIR) 2022, y también se encuentra en la posición 17 según el ranking de AméricaEconomía 2021.

La actividad de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Ambiental Aplicada (BIOAL) del Departamento de Biotecnología perteneciente a la Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos (FACIMAR) de la Universidad de Antofagasta.

IV. Agradecimientos

A mis padres, quienes siempre me apoyaron y guiaron de la mejor forma posible, y que permitieron que pudiera desarrollarme en el área que amo y me apasiona.

A todos aquellos profesores que tuve a lo largo de mis años de estudios, quienes con su vocación y pasión pudieron contagiarme de motivación y me guiaron en esta hermosa carrera basada en la ciencia.

A fundación Kennedy, quienes creyeron y confiaron en mi trabajo y que gracias a su programa de becarios, mi investigación tuvo el apoyo necesario, siendo parte fundamental para el desarrollo de esta y también para la divulgación de mis resultados.

V. Dedicatoria

A mis padres, hermanos, compañeros de carrera que fueron parte fundamental de mi desarrollo como profesional y a mi profesor tutor, Angello Retamal.

VI. Lista de Tablas

Tabla 1. Número acumulado de casos humanos confirmados de gripe aviar A(H5N1) notificados a la OMS, 2003-2023

Tabla 2. Resumen de la cantidad de ejemplares muestreados con resultado positivo a la fecha de 30.04.2023 según SERNAPESCA.

Tabla 3. Peso de los tubos antes y después de juntar las muestras y centrifugar.

Tabla 4. Indexación de las muestras de membrana de filtro y osmosis para el PCR.

Tabla 5. Mezcla para PCR de las muestras directas.

Tabla 6. Mezcla para PCR de las muestras diluidas.

Tabla 7. Condiciones para PCR de las muestras directas y diluidas.

Tabla 8. Resultados obtenidos con el espectrofotómetro BioSpec-nano.

Tabla 9. Resultados obtenidos con el espectrofotómetro BioSpec-nano.

Tabla 10. Indexación de las muestras de agua de humedal para el PCR.

Tabla 11: Indexación de las muestras de H1 y H3 para PCR.

Tabla 12: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con enzima Gotaq.

Tabla 13: Condiciones para PCR de las muestras directas y diluidas.

Tabla 14: Rotulación de las muestras de H1 y H3 para PCR con diferentes polimerasas.

Tabla 15: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Gotaq.

Tabla 16: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Phusion.

Tabla 17: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Paq polimerasa.

Tabla 18: Condiciones para PCR de las muestras H1 y H3 con distintas polimerasas.

Tabla 19: Indexación de las muestras de H1, H3, 312 y 316 para PCR con enzima Phusion.

Tabla 20: Mezcla para PCR de las muestras H1, H3,312 y 316 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Phusion.

Tabla 21: Condiciones para PCR de las muestras H1, H3, 312 y 316 con enzima Phusion.

Tabla 22: Condiciones para PCR de las muestras H1, H3, 312 y 316 con enzima Phusion, Thermo Fisher.

Tabla 23: Indexación de las muestras de 312 y 316 para PCR con enzima Phusion.

Tabla 24: Mezcla para PCR de las muestras 312 y 316 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Phusion.

Tabla 25: Condiciones para PCR de las muestras 312 y 316 con enzima Phusion.

Tabla 26: Mezcla para PCR para visualizar la dimerización de los primers MBTuni12 y MBTuni13.

Tabla 27: Indexación de las reacciones para la dimerización de partidores.

Tabla 28: Indexación de las muestras de filtro y membrana de osmosis, y muestras de agua de humedal para PCR con enzima Phusion.

Tabla 29: Mezcla para PCR de las muestras de filtro y membrana de osmosis, y muestras de agua de humedal La Chimba con enzima Phusion.

Tabla 30: Concentraciones de las muestras de Influenza positivas obtenidas con el espectrofotómetro BioSpec-nano.

VII. Lista de Figuras

Figura 1. Representación gráfica del virus de la Influenza Aviar.

Figura 2. Panel dinámico del SAG que presenta los resultados de los muestreos realizados hasta la fecha del 30.04.2023.

Figura 3. Cantidad y dispersión de planteles industriales positivos por tipo de producción y por región.

Figura 4. Mapa del humedal La Chimba.

Figura 5: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras directas y diluidas de las membranas de filtro y osmosis.

Figura 6: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras directas de agua de Humedal La Chimba.

Figura 7: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras diluidas de agua de Humedal La Chimba.

Figura 8: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1 y H3 con partidores para H5 y gen M.

Figura 9: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13.

Figura 10: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1, H3, 312 y 316 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, utilizando parámetros descritos en un paper.

Figura 11: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1, H3, 312 y 316 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, utilizando parámetros descritos entregados por Thermo Fisher.

Figura 12: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran los productos de PCR de las muestras positivas de influenza 312 y 316 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, con aumento en la cantidad de primers.

Figura 13: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de la dimerización de los partidores MBTuni12 y MBTuni13 a distintas concentraciones finales dentro de la reacción.

Figura 14: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran las muestras de filtros y membrana de osmosis; y muestras de agua de humedal con las condiciones de PCR estandarizadas.

Figura 15: Imagen referencial del genoma de influenza A.

VIII. Lista de abreviaturas

COVID 19: *Coronavirus disease 2019*.

ARN: Ácido ribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

IA: Influenza aviar.

IABP: Influenza aviar de baja patogenicidad.

IAAP: Influenza aviar de alta patogenicidad.

HA: Hemaglutinina.

NA: Neuraminidasa.

M1: Proteína de matriz.

M2: Proteína de membrana.

PB2: Proteína polimerasa básica 2.

PB1: Proteína polimerasa básica 1.

PA: Proteína polimerasa ácida.

NS1: Proteína no estructural 1.

RNP: Ribonucleoproteína.

OD: Densidad óptica, *Optical density*.

OMS: Organización mundial de la salud.

OMSA: Organización mundial de sanidad animal.

SAG: Servicio agrícola y ganadero.

SERNAPESCA: Servicio nacional de pesca y acuicultura.

MINSAL: Ministerio de salud.

Indice

Capítulo 1: Estudio clínico de fase 3 para evaluar la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de la vacuna Sinovac contra la infección por SARS-CoV-2 en población pediátrica: De la investigación básica a la investigación clínica.	12
1. Introducción	13
1.1. Investigación clínica	13
1.2. Buenas prácticas clínicas	14
1.3. Formulación de Sinovac	14
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo general:	16
2.2. Objetivos específicos:	16
3. Métodos	16
4. Resultados	17
5. Conclusión	17
Capítulo 2: Vigilancia genómica del virus de Influenza Aviar en muestras de agua ambientales obtenidas en zonas estratégicas de la ciudad de Antofagasta.	18
Resumen	19
Palabras clave. Influenza Aviar; Pandemia; PCR; Vigilancia genómica.	19
Abstract	20
Keywords. Avian Influenza; Pandemic; PCR; Genomic Surveillance.	20
1. Introducción	21
1.1. Situación de la influenza aviar a nivel mundial	21
1.2. Descripción del virus de la influenza aviar	21
1.3. Cuadro clínico del virus de la influenza aviar AH5N1	23
1.4. Mortalidad por el virus de la influenza aviar AH5N1	24
1.5. El virus de la influenza aviar como posible brote pandémico	26
1.6. Situación actual en Chile respecto al virus de la influenza aviar AH5N1	26
1.7. Consecuencias de los brotes del virus AH5N1	29
1.8. Importancia de controlar y monitorear estos brotes	30
2. Hipótesis y Objetivos	31
2.1. Hipótesis	31
2.2. Objetivo General	31
2.3. Objetivos específicos	31
3. Materiales y métodos	32
	10

3.1. Materiales	32
3.2. Métodos	34
4. Resultados	49
4.1. Muestras de filtro y membranas de osmosis de Aguas Antofagasta	49
4.2. Muestras de agua de humedal La Chimba	50
4.3. Estandarización de PCR con muestras positivas de Influenza	51
5. Discusión	56
6. Conclusiones	59
7. Referencias bibliográficas	60
8. Anexos	66

Capítulo 1: Estudio clínico de fase 3 para evaluar la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de la vacuna Sinovac contra la infección por SARS-CoV-2 en población pediátrica: De la investigación básica a la investigación clínica.

1. Introducción

1.1. Investigación clínica

A finales del año 2019 se reportaron varios casos de neumonía severa en la provincia de Wuhan, China, lo que terminó desatando una pandemia mundial (Andersen et al., 2020).

Es sabido desde hace algunos años que los coronavirus presentan un alto riesgo de pandemia, y en este caso el SARS-CoV-2 (Síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2) es el noveno coronavirus reportado con la capacidad de infectar humanos y el séptimo identificado dentro de los últimos 20 años (Holmes et al., 2021).

Los síntomas clínicos de la enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19, *Coronavirus disease 2019*) varían entre tos seca, fiebre, disnea (dificultad para respirar), dolor de cabeza y neumonía (P. Zhou et al., 2020). Los primeros casos de infección por este nuevo coronavirus fueron asociados a un mercado de mariscos y animales vivos en Wuhan, pero tiempo después personas que no habían estado expuestas a animales contrajeron la infección, lo que indicaba que este virus podía ser transmitido de persona a persona (Rupani et al., 2020).

Esta enfermedad se propagó en varios países y se declaró emergencia de salud pública de preocupación internacional por la OMS el 31 de enero del 2020. Posteriormente la epidemia se intensificó propagándose a más de 215 países, lo que llevó a la OMS a declarar la enfermedad por COVID-19 como pandemia mundial el 11 de marzo del 2020 (Malik et al., 2020).

La crisis sanitaria a nivel mundial se convirtió en una prioridad para la obtención de una vacuna segura y eficaz en un tiempo reducido. Es así que, para enero del 2021, ya se distribuían las vacunas de Pfizer/BioNTech, Moderna, Sputnik V, CanSino, Sinovac y AstraZeneca/Oxford, representando el mayor despliegue tecnocientífico en la última década (Martínez, 2021).

Pero para poder poner a disposición de la población estas vacunas o cualquier otro producto farmacéutico, es necesario realizar previamente una investigación clínica. El proceso de evaluación clínico es un proceso de cuatro etapas, donde la Fase 1 corresponde a un pequeño grupo de personas sanas que reciben el producto de investigación (PI). La Fase 2, donde el grupo de investigación se expande y ya se puede probar el PI en grupos de personas con características similares al grupo de personas a quien va dirigido el producto. En la Fase 3 el PI se administra a miles de personas y se evalúa la seguridad y eficacia del producto y en algunos casos se puede realizar un estudio de Fase

4, post comercialización para realizar seguimiento aún después de que el producto haya sido aprobado y autorizado (Urbiztondo et al., 2020)

1.2. Buenas prácticas clínicas

Para realizar una correcta investigación clínica y bajo estándares de calidad internacional, es necesario capacitar al personal del estudio clínico bajo las normas de GCP (Good clinical practice). Las GCP son un estándar de carácter internacional de calidad científica y ética que nos ayuda al diseño, realización, seguimiento, auditorias, registros, análisis y elaboraciones de ensayos clínicos (Vijayanathan., 2008). El propósito principal y fundamental de las GCP es proteger los derechos de aquellas personas que decidan voluntariamente entrar a un estudio clínico y también garantizar la validez y calidad científica de todos los datos recopilados a lo largo del estudio (Dixon, 1999).

1.3. Formulación de Sinovac

La pandemia causada por el SARS-CoV-2 requirió de la colaboración de Universidad y Centros de Investigación, de la Industria Farmacéutica y de las Agencias Regulatorias para lograr obtener rápidos avances en lo que vacunas respecta, y así poder controlar la severidad del COVID-19. Entre las diversas vacunas desarrolladas, se encuentra CoronaVac elaborada por la compañía biofarmacéutica China Sinovac Life Sciences. CoronaVac es una formulación basada en un virus inactivado propagado en células VERO, coadministrado con hidróxido de aluminio como adjuvante (Fonseca et al., 2022),(Jin et al., 2022).

En los estudios preclínicos en adultos, la vacuna CoronaVac demostró una eficacia y seguridad preliminares en animales (Skowronski et al., 2013). La vacuna fue aprobada por la Administración Nacional de Productos Médicos (NMPA) el 13 de abril de 2020 para ensayos clínicos. El ensayo clínico de Fase 1/2 en adultos sanos de entre 18 y 59 años se inició en la provincia de Jiangsu, China, el 16 de abril de 2020. El ensayo clínico de Fase 1/2 en adultos mayores de 60 años o más se lanzó en la provincia de Hebei, China el 22 de mayo de 2020, y el ensayo clínico de Fase 1/2 en niños y adolescentes de 3 a 17 años se lanzó en la provincia de Hebei, China, el 31 de octubre de 2020. Estos tres ensayos clínicos completaron la evaluación de seguridad e inmunogenicidad 28 días después vacunación de dos dosis. Los resultados mostraron una buena seguridad e inmunogenicidad en adultos, ancianos, niños y adolescentes (Nauta, 2020), (Treanor et

al., 2012). Se llevaron a cabo tres ensayos clínicos Fase 3 de la vacuna COVID-19 en Brasil (18 años o más), en Indonesia (18-59 años) y en Turquía (18-59 años), que adoptaron el método aleatorizado, doble ciego, con un diseño de estudio controlado con placebo para evaluar la eficacia de la vacuna (WHO, 2013), (Storsaeter et al., 1998). Los resultados en Brasil mostraron una buena eficacia y seguridad de la vacuna, y fue aprobada para su comercialización condicional en China el 5 de febrero de 2021 (número de aprobación: 2021S00156, 2021S00157). Además, CoronaVac fue aprobado por la OMS para uso de emergencia en adultos en junio 01, 2021(Griffin et al., 2011).

Para evaluar la eficacia y seguridad de la vacuna COVID-19 en niños y adolescentes, se formula este protocolo de estudio clínico de Fase 3 por la Compañía Sinovac y el Centro Patrocinador Pontificia Universidad Católica de Chile. El estudio fue realizado en colaboración entre la Pontificia Universidad Católica de Chile, el Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia y 11 centros distribuidos en Antofagasta, Santiago, Valparaíso, Temuco y Valdivia.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Evaluar la eficacia de dos dosis de CoronaVac contra casos de COVID-19 sintomáticos confirmados por RT-PCR en participantes entre 6 meses y 17 años.

2.2. Objetivos específicos:

1. Realizar los cursos correspondientes para obtener la certificación en buenas prácticas clínicas y trabajar bajo estas normas internacionales.
2. Aprender y manejar la base de datos Medidata a la cual se subirá la información generada en las fichas clínicas de los sujetos de estudio.
3. Revisar y curar la información obtenidas por los médicos en las fichas clínicas.

3. Métodos

Para cumplir con el primer objetivo específico fue necesario realizar una capacitación en Good Clinical Practice. Esta capacitación la realicé por primera vez de forma online en The Global Health Network el día 8 de septiembre del 2021. Luego, volví a realizar una capacitación en GCP de forma online en NIDA Clinical Trials Network con fecha del 20 de julio del 2022.

Respecto al segundo objetivo específico, también tuve que realizar un curso para aprender a manejar la plataforma con la cual se trabajó, en este caso, se utilizó Medidata, una base de datos para fichas clínicas digitales de ensayos clínicos. Esta misma plataforma solicitaba realizar una inducción con posteriores evaluaciones para quedar capacitado y poder trabajar en ella.

Finalmente, con los primeros dos objetivos listos, pude desarrollar mi función como *Data Manager* en el estudio clínico, revisando y curando la información de las fichas clínicas para ingresar los datos en la plataforma Medidata, cumpliendo así con el objetivo número tres.

4. Resultados

Obtuve las certificaciones y entrenamiento en Buenas prácticas clínicas (anexo 1 y 2), además de aprobar el entrenamiento para trabajar con la plataforma Medidata y por ende también desarrollar mi función como *Data Manager* en el estudio clínico.

El trabajo realizado en el centro Hospital Clínico Universidad de Antofagasta, nos permitió evaluar la seguridad, efectividad e inmunogenicidad de la vacuna CoronaVac en población pediátrica. Los resultados fueron comunicados en un reporte interino, con los cuales el Instituto de Salud Pública autorizó la implementación de emergencia en población pediátrica de la vacuna CoronaVac. Además, una vez terminado el protocolo de estudio se publicaron los resultados de inmunogenicidad y eficacia (anexo 3), en donde nuestro centro de investigación es coautor de este trabajo.

5. Conclusión

En conclusión, el trabajo de distintos investigadores, médicos, enfermeras, e incluso biotecnólogos de la ciudad de Antofagasta y en colaboración con otros centros de investigación en otros sectores del país, ayudó de forma positiva a hacerle frente a esta pandemia del COVID 19, obteniendo datos de calidad sobre la seguridad y eficacia de la vacuna CoronaVac en la población pediátrica de Chile.

**Capítulo 2: Vigilancia genómica del virus de Influenza
Avar en muestras de agua ambientales obtenidas en
zonas estratégicas de la ciudad de Antofagasta.**

Resumen

La influenza aviar (H5N1) ha causado diversos brotes en varios países en aves de corral, mamíferos marinos, jugando un papel clave para la transmisión de este virus, las aves migratorias. Chile no está ajeno a esta situación, lo que ha planteado una preocupación sobre su impacto en la salud animal, la salud pública, la posible pérdida de la biodiversidad y la economía del país. Es por esta razón que se enfatiza la necesidad de controlar y monitorear estos brotes, y se argumenta la importancia de realizar una vigilancia continua en zonas de la región de Antofagasta para la detección temprana de este patógeno. Para esto, el objetivo de esta investigación es establecer un protocolo estandarizado para la detección de influenza aviar en muestras de agua ambientales.

Palabras clave. Influenza Aviar; Pandemia; PCR; Vigilancia genómica.

Abstract

Avian influenza (H5N1) has caused several outbreaks in several countries in poultry, marine mammals and migratory birds play a key role in the transmission of this virus. Chile is no stranger to this situation, which has raised concerns about its impact on animal health, public health, the possible loss of biodiversity and the country's economy. It is for this reason that the need to control and monitor these outbreaks is emphasized, and the importance of continuous surveillance in areas of the Antofagasta region for the early detection of this pathogen is argued. The objective of this research is to establish a standardized protocol for the detection of avian influenza in environmental water samples.

Keywords. Avian Influenza; Pandemic; PCR; Genomic Surveillance.

1. Introducción

1.1. Situación de la influenza aviar a nivel mundial

En la actualidad, la situación mundial de la influenza aviar es variable en diferentes regiones del mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han informado brotes de influenza aviar en aves de corral y otros animales en varios países de Asia, Europa, África y América. Los subtipos de virus de la influenza aviar que se han identificado incluyen H5N1, H5N8 y H7N9, entre otros (OMS, 2023).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) ha informado que la temporada epidémica de la Influenza aviar de alta patogenicidad sigue en curso con brotes en aves de corral, aves silvestres y mamíferos. Durante esta temporada, el subtipo AH5N1 ha sido el predominante y ha causado una alta tasa de mortalidad en aves silvestres, así como un número creciente de casos en mamíferos terrestres y acuáticos, lo que aumenta la preocupación por la amenaza potencial para la sanidad de los animales domésticos y silvestres, la biodiversidad y la salud pública (OMS OPS, 2022).

En algunos países, los brotes de influenza aviar han llevado a la implementación de medidas de prevención y control, como la cuarentena de aves infectadas, el sacrificio de aves y la desinfección de granjas avícolas. Además, se ha llevado a cabo una vigilancia constante para detectar cualquier cambio en la estructura genética del virus de la influenza aviar que pueda aumentar su capacidad de transmisión de las aves a los humanos y su potencial pandémico (OMS, 2023)

1.2. Descripción del virus de la influenza aviar

El virus H5N1 es un subtipo de virus de influenza A que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Sus partículas virales son pleomórficas y poseen un diámetro aproximado de 100 nm, o pueden ser filamentosas, con una longitud de 300nm (Knipe et al., 2013). Su genoma está compuesto por 8 segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo que codifican para al menos 10 proteínas virales diferentes (White., 2018). El segmento 1 codifica la proteína Polimerasa Básica 2 (PB2), la cual tiene un papel fundamental en la replicación viral en las células hospederas. El segmento 2 codifica la proteína Polimerasa Básica 1 (PB1), necesaria para la transcripción y replicación del genoma viral. El segmento 3 codifica la proteína Polimerasa Ácida 1 (PA), importante en la regulación de la transcripción y replicación viral. Los segmentos 4 y 6 codifican las

proteínas de la envoltura viral hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), respectivamente, que son dianas comunes de las vacunas contra la influenza. Los segmentos 5, 7 y 8 codifican las proteínas: nucleoproteína (NP), matriz (M) y proteína no estructural 1 (NS1), respectivamente, las cuales tienen un papel importante en la entrada del virus a la célula hospedera, la liberación de partículas virales y la evasión del sistema inmunitario del hospedero (Herrero, 2008), (Casillas et al., 2007), (Calvo et al., 2009).

Estructuralmente, el virus Influenza A H5N1 está cubierto de las glicoproteínas: hemaglutinina y neuraminidasa, que representan el 80% y 17% de proteínas totales de superficie, respectivamente. La proteína M2 representa un menor porcentaje dentro de las proteínas de superficie, estando presente alrededor de 16 a 20 moléculas por partícula de virus. El núcleo de A H5N1 está rodeado por M1, y dentro del núcleo se encuentra el complejo RNP, que está compuesto por la hebra de ARN cubierta con nucleoproteína y una ARN polimerasa dependiente de ARN (Nurzijah et al., 2022) (Figura1).

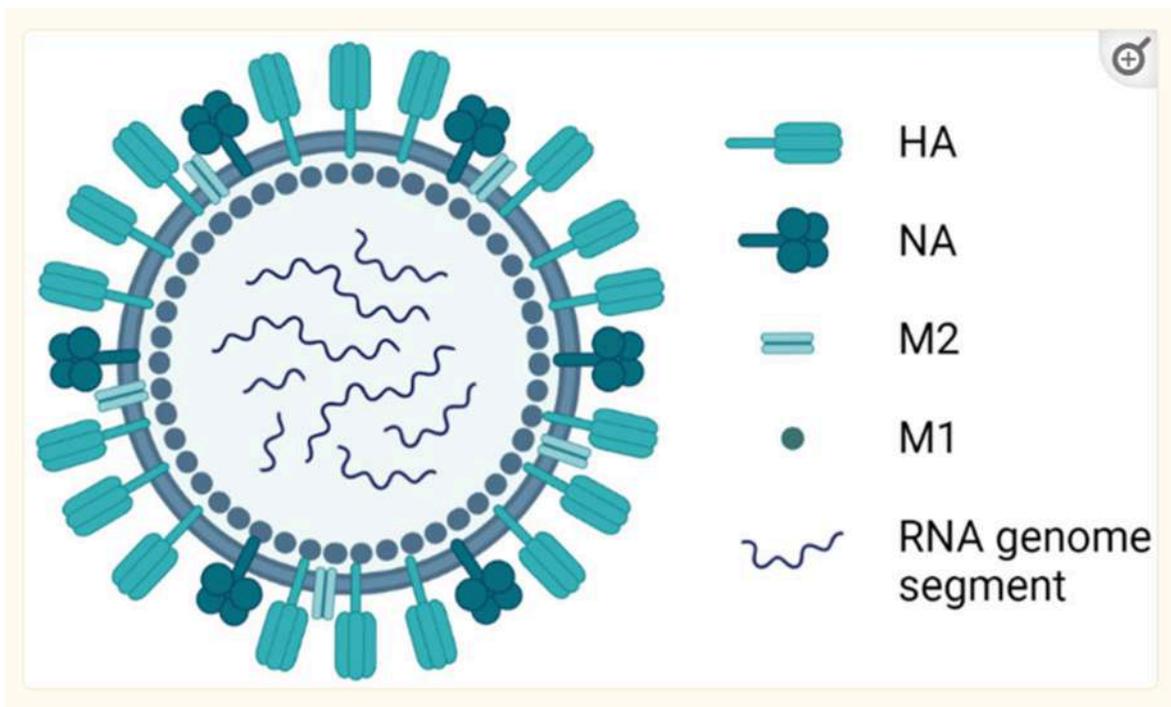


Figura 1: Representación gráfica del virus de la Influenza Aviar: HA (Hemaglutinina), NA (Neuraminidasa), M2 (Proteína de matriz 2), M1 (Proteína de matriz 1) (Nurzijah et al., 2022).

Los virus de influenza aviar se pueden clasificar en dos tipos según su patogenicidad: virus de la Influenza A de baja patogenicidad (IABP) y virus de la Influenza A de alta patogenicidad (IAAP) (Capua et al., 2006) . Los virus IABP son generalmente avirulentos o de baja patogenicidad,

causan infecciones respiratorias leves o subclínicas y se asocian con una baja mortalidad en aves. En contraste, los virus IAAP pueden causar enfermedad sistémica y una alta tasa de mortalidad en las aves (Pantin., 2007).

La patogenicidad de los virus de influenza aviar está relacionada con la capacidad de replicarse en ciertos órganos de las aves. Esta capacidad está asociada con la presencia de memorias instantáneas o inserciones de aminoácidos básicos en el sitio de corte de la hemaglutinina (HA) (Swayne, 2007). Los virus IAAP tienen una secuencia de aminoácidos básicos en el sitio de corte de la HA, lo que les permite replicarse en órganos extrapulmonares, mientras que los virus IABP tienen una secuencia de aminoácidos menos básicos en el sitio de corte de la HA, lo que restringe su replicación a las células del tracto respiratorio (Capua et al., 2006).

Los puntos críticos de la molécula de hemaglutinina que influyen en la virulencia del virus son: a) los sitios antigénicos; b) el sitio de reconocimiento del receptor celular; y c) el sitio donde se produce la proteólisis que induce el cambio conformacional de la molécula de HA (Herrero, 2008).

Estudios en patos silvestres de Norteamérica han comprobado que puede haber coinfección por dos subtipos diferentes de virus, que circulan al mismo tiempo en el organismo del animal (Hatchette et al., 2004). Este proceso incrementa la probabilidad de que se produzcan recombinaciones genéticas y, en consecuencia, la aparición de nuevos subtipos virales (Gauthier et al., 2007).

1.3. Cuadro clínico del virus de la influenza aviar AH5N1

La enfermedad altamente patógena en aves totalmente susceptibles puede tener diferentes presentaciones clínicas dependiendo de la especie, edad y tipo de ave, características específicas de la cepa vírica involucrada y factores ambientales (OMSA, 2021). Se ha comprobado que las aves migratorias pueden llevar consigo virus de influenza aviar de alta y baja patogenicidad de forma asintomática durante largas distancias (Lycett et al., 2019). Las aves silvestres albergan de forma natural todos los tipos, subtipos y variantes del virus influenza, lo que implica que la evolución del virus sea bastante constante en ellas. Los virus se reproducen en el tracto gastrointestinal de estas aves y, por consiguiente, se eliminan en grandes cantidades a través de las heces (Herrero, 2008).

La influenza aviar se caracteriza por una rápida disminución en la producción de huevos y un aumento en la mortalidad con signos respiratorios y nerviosos. La exposición al virus de la IA provoca una alta morbilidad en las aves expuestas, pero la mortalidad varía según la patogenicidad de la cepa del virus y las condiciones ambientales. Los síntomas incluyen hemorragias subcutáneas, edema de la cabeza, vesículas en la cresta y las barbas. Se observan hemorragias en la serosa de

todas las vísceras y en la mucosa y estructuras linfoides de los tractos intestinales y respiratorios (Shane, 2005).

La influenza en los seres humanos se propaga principalmente por la inhalación de gotículas infectadas y posiblemente por contacto indirecto a través de objetos contaminados, con una posible autoinoculación en la mucosa conjuntival o en el tracto respiratorio superior (Liem, 2005). El virus A H5N1 puede transmitirse de aves a personas y posiblemente del ambiente a personas, pero la transmisión de persona a persona es poco probable y no se ha mantenido hasta la fecha. La exposición a pollos enfermos, el sacrificio, desplume o preparación culinaria de aves enfermas, y el consumo de sangre o pollo poco cocinado también pueden implicarse en la transmisión (Godoy, 2006).

La mayoría de los pacientes con Influenza A H5N1 presentan fiebre alta y síntomas del tracto respiratorio bajo. La diarrea acuosa es común y puede preceder a los síntomas respiratorios. La disnea y la neumonía son hallazgos comunes y se desarrollan en el transcurso temprano de la enfermedad, con cambios radiográficos como consolidación y broncograma aéreo. Los síntomas del tracto respiratorio alto son menos comunes y la conjuntivitis rara vez se presenta. En algunos casos, la enfermedad puede presentarse con encefalopatía y diarrea sin síntomas respiratorios (Franco et al., 2007).

Una nueva preocupación es que estudios han comprobado que la Influenza aviar A H5N1 podría ingresar al sistema nervioso central en mamíferos, causando neuroinflamación y neurodegeneración (Jang et al., 2009).

1.4. Mortalidad por el virus de la influenza aviar AH5N1

De acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), la mortalidad en aves causada por el virus de la Influenza aviar A H5N1 puede ser muy variable y depende de muchos factores, incluida la edad y la especie del ave, la virulencia de la cepa del virus, la calidad de manejo y condiciones ambientales (OMSA, 2021). Este virus ha sido responsable de la muerte de millones de aves en diferentes partes del mundo. La infección por A H5N1 puede producir una mortalidad de hasta el 100% en pollos domésticos. El subtipo de virus H5N1 de la IAAP ha generado una gran preocupación desde 1997, no sólo en la industria avícola, sino también en la salud humana (Akanbi et al., 2014).

Mientras que la mayoría de los virus de influenza que se encuentran en las aves no son transmisibles a los humanos, ciertas cepas de la influenza aviar altamente patógena pueden infectar a las personas, lo que representa un riesgo significativo para la salud pública (OPS, 2023).

Desde enero de 2003 hasta el 26 de enero de 2023, se han notificado 868 casos de infección humana con el virus de la gripe aviar A (H5N1) en 21 países de todo el mundo. De estos casos, 457 resultaron mortales, lo que representa una tasa de letalidad del 53% (OMS, 2023b) (Tabla 1).

Tabla 1: Número acumulado de casos humanos confirmados de gripe aviar A(H5N1) notificados a la OMS, 2003-2023. C: casos; M: muertes. (OMS, 2023a).

País	2003-2009		2010-2014		2015-2019		2020		2021		2022		2023		total
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M			
Azerbaián															
Bangladés															
Cambodia			7	0										6	7
Canadá															
China	8	5												4	2
Yibuti															
Egipto	0	7	20	0	49	3								59	20
India															
Indonesia	62	34	5	1										00	68
Irak															
Laos															
Birmania															
Nepal															
Nigeria															
Pakistán															
España															

Tailandia	5	7													5	7
Turquía	2														2	
Reino Unido																
U.S.A																
Vietnam	12	7	5												27	4
Total	68	82	33	25	60	8									68	57

1.5. El virus de la influenza aviar como posible brote pandémico

La influenza aviar es una enfermedad que se encuentra predominantemente en las aves, aunque también puede afectar a los seres humanos. La infección en los humanos generalmente se produce por el contacto directo con aves infectadas o áreas contaminadas. Aunque los virus de la influenza aviar identificados hasta ahora no se transmiten fácilmente de persona a persona, su circulación actual en las aves de corral es preocupante, debido a la gravedad de la enfermedad que pueden causar en los humanos y su capacidad potencial para mutar y volverse más contagiosos entre las personas (OMS,2023).

Las pandemias ocurren cuando se presenta una nueva glicoproteína H, con o sin neuraminidasa acompañante, a la cual los humanos no tienen inmunidad previa (Herrero, 2008). El virus A H5N1 tiene la capacidad de causar enfermedades graves en los seres humanos, aunque su capacidad de infección es limitada. Si este virus sufre modificaciones y adquiere la capacidad de propagarse de manera eficiente de persona a persona, como lo hacen los virus de la gripe humana, podría representar un grave riesgo de pandemia (Calvo et al., 2009).

1.6. Situación actual en Chile respecto al virus de la influenza aviar AH5N1

El Servicio Agrícola Ganadero en Chile ha declarado una Emergencia de IAAP en todas las 16 regiones del país, lo que corresponde a 125 Zonas Bajo Control Sanitario activo a nivel nacional. La preocupación se extiende ahora también a los mamíferos marinos, en particular al lobo marino común, que está sujeto a una medida de administración pesquera y cuya manipulación corresponde al SERNAPESCA. Existe coordinación entre ambos servicios en caso de una posible expansión de nuevos casos de afectación en la fauna marina silvestre. SERNAPESCA está actuando en relación a las especies bajo su tutela en coordinación con el Estado en el contexto de la alerta sanitaria por gripe aviar (SERNAPESCA, 2023)

Tabla 2: Resumen de la cantidad de ejemplares muestreados con resultado positivo a la fecha de 28.07.2023 según SERNAPESCA.

SERNAPESCA - INFLUENZA AVIAR						
Región	Chungungo	Delfín Chileno	Lobo Marino	Marsopa Espinosa	Pinquino de Humboldt	Total General
Arica y Parinacota	1		2			3
Tarapacá	1		10		1	12
Antofagasta			2	1	2	5
Atacama			4	1		5
Cochile			2		1	3
Valparaíso			3			3
O'Higgins			1			1
Maulino		1	1			2
Ñuble		1				1

Biobío			3			3
La Araucanía						
Los Ríos						
Los Lagos			4			4
Aysén			2			2
Magallanes		1	2			3
Total General	2	2	30	2	4	4 7

Según el académico de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, el Dr. Christopher Hamilton-West, el virus A H5N1 de la gripe aviar ha sido detectado en diversas especies de mamíferos y aves en Norteamérica y Chile, preocupando por su impacto en la conservación de las especies y la seguridad alimentaria en el futuro. A pesar de que los síntomas en humanos han sido leves hasta el momento, el virus es capaz de producir mortalidades en un 100% de las aves domésticas afectadas. La Unidad de Epidemiología Veterinaria de la Universidad de Chile lleva más de 10 años trabajando en la vigilancia epidemiológica del virus y considera necesario reforzar las acciones para detectar posibles factores y prevenir nuevos escenarios epidemiológicos en el futuro (Vega, 2023)

Por otra parte, el SAG ha desarrollado un panel dinámico que ofrece acceso a los principales datos estadísticos relacionados con la emergencia de IA, como la cantidad de regiones afectadas, la cantidad de aves muestreadas, la distribución de muestras positivas y más. La información se presenta en forma de gráficos, mapas, consolidados y listas, y se puede filtrar fácilmente según las necesidades del usuario. (SAG, 2023) (Figura 2).



Figura 2: Panel dinámico del SAG que muestra los resultados de los muestreos realizados hasta la fecha del 01.08.2023.

Debido a los diversos casos han aparecido hasta la fecha desde el primer caso confirmado en Chile, el SAG ha tomado medidas como la suspensión de exportación de carne de ave al identificar el primer caso de IA en una planta industrial avícola. El SAG procedió a activar el protocolo que consiste en el sacrificio de las aves infectadas con la finalidad de evitar la propagación de la enfermedad a otras plantas avícolas (Gob, 2023). Después de este primer caso, se han reportado otros casos positivos en plantas avícolas (Figura 3), por lo que el SAG actuó bajo las normativas de la Resolución N° 7.192 - Declara emergencia zoonosológica y activa Sistema Nacional de Emergencia del Servicio Agrícola y Ganadero; y la Resolución N° 7.589 - Establece suspensión de autorizaciones de caza, captura, recolección de huevos y crías de aves silvestres, en el marco de los artículos 16, 17, 18 y 20 del D.S. N° 5 de 1998, del Ministerio de Agricultura, por contingencia sanitaria de influenza aviar patogenicidad (Servicio Agrícola y Ganadero, 2023)

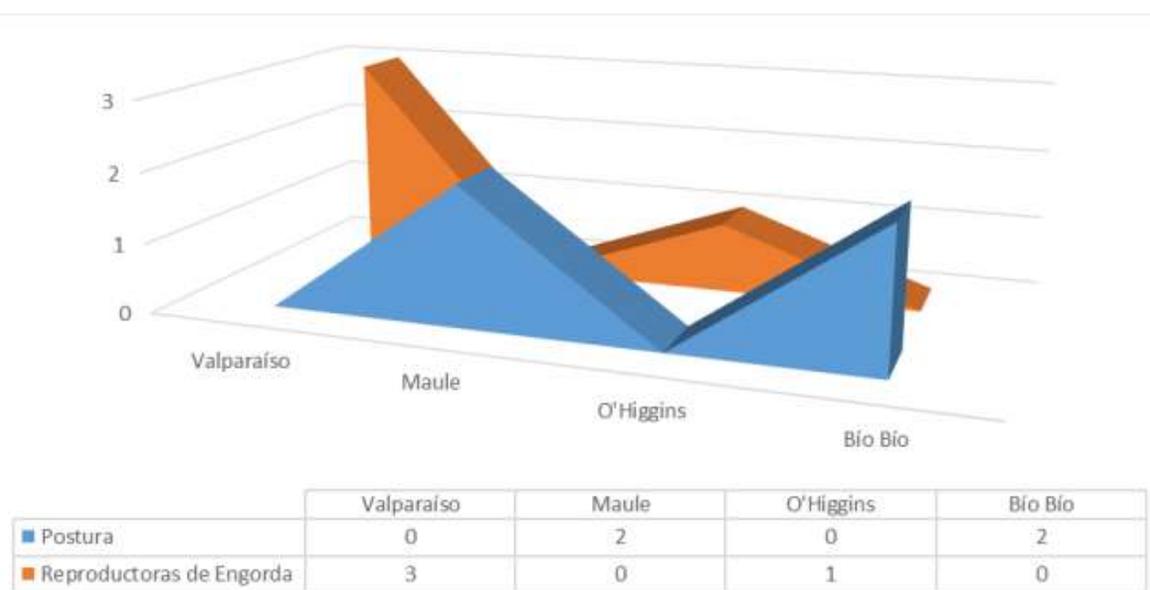


Figura 3: Cantidad y dispersión de plantales industriales positivos por tipo de producción y por región (SAG, 2023a).

Uno de los aspectos más preocupantes dentro de todo esto, es que el MINSAL informó sobre el primer caso de Influenza Aviar AH5N1 en un hombre de 53 años proveniente de la Región de Antofagasta, y el Instituto de Salud Pública confirmó que se trataba de IA (MINSAL, 2023)

1.7. Consecuencias de los brotes del virus AH5N1

Las consecuencias que ha traído la influenza aviar abarca desde lo económico, hasta la salud pública y del ecosistema.

Según el Dr. Keith Hamilton, jefe de departamento de preparación y resiliencia de la OMSA, la IA podría traer consecuencias devastadoras en el ámbito económico. Esto ya que los productores avícolas pueden sufrir una mortalidad elevada en sus bandadas; la contención de los brotes requiere de sacrificar aves sanas; la presencia de IAAP restringe el comercio de aves y carne de aves; hay pérdidas de puestos de trabajos en las industrias avícolas; y hay reducción en los viajes y el turismo en zonas afectadas, lo que resulta en pérdidas económicas para los productores avícolas y los países o gobiernos afectados (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2023)

La alerta sanitaria en Perú se extiende durante todo el 2023 debido a los elevados índices de muerte de lobos marinos y aves a causa de la gripe aviar H5N1. Además, se han registrado casos en Argentina, Camboya, Ecuador y China, algunos de ellos fatales. Existe un posible riesgo de desastre ecológico, ya que la infección se ha detectado en diversas especies de mamíferos terrestres y acuáticos en Norteamérica. El Dr. Hamilton-West de la Universidad de Chile, destaca la necesidad de reforzar la vigilancia epidemiológica para prevenir posibles cambios del virus y proteger la producción avícola en la región (Vega, 2023)

La OMS destaca la importancia de tomar medidas ante la diversidad de virus gripales de origen zoonótico que han causado infecciones en humanos para evitar riesgos en la salud pública. Esto implica reforzar la vigilancia de las poblaciones animales y humanas, investigar cada infección zoonótica y prepararse para una posible pandemia. Además, se recomienda vacunar a los trabajadores avícolas contra la gripe estacional para prevenir la mutación vírica y la transmisión entre personas. La prevención es clave en la protección de la salud pública (OMS, 2023)

1.8. Importancia de controlar y monitorear estos brotes

Resumiendo lo descrito anteriormente, es importante monitorear y vigilar los casos de influenza aviar por varias razones. En primer lugar, la influenza aviar puede causar enfermedad grave y mortalidad en las aves de corral (Akanbi et al., 2014), lo que puede tener un impacto económico significativo en la industria avícola. Además, la influenza aviar puede transmitirse de las aves a los humanos y, en casos raros, puede causar enfermedad grave en los seres humanos, incluyendo la neumonía y, en algunos casos, la muerte (Calvo et al., 2009).

En segundo lugar, los virus de la influenza aviar pueden mutar rápidamente y evolucionar para adaptarse a nuevas especies hospedadoras, incluyendo los humanos (Dhama et al., 2013). Por lo tanto, es importante realizar una vigilancia constante de los virus de la influenza aviar para detectar cualquier cambio en su estructura genética y evaluar el riesgo de transmisión de las aves a los humanos y de una posible pandemia (Herrero, 2008).

En tercer lugar, la detección temprana de brotes de influenza aviar puede ayudar a prevenir la propagación del virus y minimizar su impacto en la salud pública y la economía. Esto implica la implementación de medidas de prevención y control, como la cuarentena de aves infectadas y la eliminación segura de los cadáveres de aves (SAG, 2023b).

La situación de la influenza aviar sigue siendo motivo de preocupación en muchos países debido a la alta tasa de mortalidad en las aves de corral y el riesgo potencial de transmisión a los humanos. Por lo tanto, es importante seguir monitoreando y vigilando la situación de la influenza aviar a nivel mundial para detectar cualquier brote y tomar medidas oportunas para prevenir su propagación.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

La estandarización de la técnica de PCR convencional para la identificación de influenza aviar en muestras de agua ambientales, nos permitirá detectar de forma temprana la presencia de este virus, mejorando la vigilancia epidemiológica y la seguridad sanitaria de la región.

2.2. Objetivo General

Elaborar un protocolo estandarizado de PCR para detectar influenza aviar desde muestras de agua ambientales.

2.3. Objetivos específicos

1. Elaborar un protocolo estandarizado para aislar material genético desde muestras de agua de humedales de la ciudad de Antofagasta.

2. Estandarizar un protocolo de identificación molecular mediante PCR convencional para el virus de la influenza aviar.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos y enzimas

- Agua de biología molecular
- Agua libre de nucleasas
- Buffer de carga para PCR
- Cloroformo alcohol isoamílico
- Etanol al 75%
- Gel Red (Biotium)
- Glycoblue (Invitrogen)
- Gotaq green master mix 2X (Promega)
- Hidróxido de sodio 1N
- Isopropanol
- Leche en polvo desnatada en agua destilada al 0.01%
- LunaScript RT SuperMix Kit (Biolabs)
- Marcador de peso molecular 1kb y 100 pb (MaestroGen)
- Partidores MBTuni 12 y MBTuni13
- Partidores RF1073 y RF1074
- Partidores RF1151 y RF1152
- Paq5000 DNA polymerase (Agilent)
- Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific)
- Sulfato de aluminio y potasio al 0.02%
- Trizol (Invitrogen)

- ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit

3.1.2. Equipos y otros

- Balanza analítica
- Botellones estériles de 1 L
- Cámara de electroforesis
- Campana de flujo laminar
- Centrifuga
- Espectrofotómetro UV-VIS BioSpec-nano
- Fuente de poder
- Máquina de hielo
- Micropipetas
- Puntas de micropipetas con filtro
- Refrigeradores
- Sonicador
- Termociclador
- Tubos estériles
- Vasos precipitados

3.1.3. Muestras

- Agua de Humedal la Chimba
- Membrana de filtro y osmosis de Aguas Antofagasta
- Muestra de Influenza positivas: H1, H3, 312 y 316

3.2. Métodos

3.2.1. Muestras de filtro y membrana de osmosis de Aguas Antofagasta

Recolección de la muestra

Las muestras de filtro y membranas de osmosis fueron facilitadas por el Dr. Fernando Silva, docente de la Universidad de Antofagasta, quien realiza trabajos de investigación con Aguas Antofagasta.

Sonicación de las muestras de membrana de filtro y osmosis

Se tomaron las muestras de filtro y membrana de osmosis y se aplicó un pulso de 70% de amplitud para desprender toda aquella partícula que pudiese estar adherida en las membranas. Se sonicó por un tiempo de 15 segundos y luego se dejó reposar por 45 segundos, así por un total de 10 minutos.

Centrifugación de las muestras de membrana de filtros y osmosis

La muestra se dividió en 16 tubos falcon de 50 ml, ocho tubos con muestra de filtro y ocho tubos con muestra de membrana de osmosis. Los tubos fueron centrifugados a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C y luego se eliminó el sobrenadante. A los tubos con el precipitado se agregó

nuevamente las muestras correspondientes y se llevó a centrifugación bajo las mismas condiciones que antes, eliminando el sobrenadante de todos los tubos excepto de un tubo de cada muestra. Con ayuda de una pipeta de 1 ml, se tomó un 1 ml del sobrenadante de las muestras a las cuales no se les eliminó el sobrenadante para resuspender el precipitado de las demás muestras (con 1 ml del sobrenadante de las muestras de membrana de filtro, se resuspendió el precipitado de las muestras de filtro y con 1 ml del sobrenadante de las muestras de membranas de osmosis, se resuspendió el precipitado de las muestras de membranas de osmosis). Esto se realizó para juntar todas las muestras de filtro en un solo tubo de muestra y lo mismo con las muestras de membrana de osmosis. Estos dos nuevos tubos de muestra se llevaron a centrifugar a 4500 rpm por 15 minutos, y se eliminó el sobrenadante que quedó.

Los tubos en donde se guardaron las muestras finales se pesaron antes y después de juntar las muestras y centrifugar para calcular el peso total de la muestra como se muestra en la tabla 3. Finalmente, estas muestras se almacenaron a -80°C hasta su respectivo uso.

Tabla 3. Peso de los tubos antes y después de juntar las muestras y centrifugar.

	Tubo vacío	Tubo con precipitado	Peso total obtenido de la muestra
Peso del tubo de la muestra de filtro	12.9846g	14.3135g	1.3289g
Peso del tubo de la muestra de membrana de osmosis	12.8741g	14.5131g	1.639g

Purificación de ARN de las muestras de filtro y membranas de osmosis

Para purificar ARN de estas muestras de filtro y membrana de osmosis, se usó el ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit, y se siguieron todos los pasos descritos en el protocolo de este kit. Se purificaron cuatro muestras en total, dos muestras de membrana de filtro, F1 y F2; y dos muestras de membrana de osmosis, O1 y O2. Luego se midió la concentración de ARN de estas muestras en el espectrofotómetro BioSpec-nano, y la muestra F1 fue descartada ya que se solidificó con resina. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su respectivo uso.

RT PCR de las muestras

Para la síntesis de ADN complementario de las muestras O1, O2 y F2, se utilizó el LunaScript RT SuperMix Kit, siguiendo todos los pasos descritos en el protocolo del kit.

Finalmente se obtuvieron un total de cinco muestras, tres muestras y dos controles. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su respectivo uso.

PCR de las muestras de membrana de filtro y osmosis

Para confirmar la presencia de Influenza en las muestras se realizó un PCR con los partidores MBTuni12 (5'-ACG-CGT-GAT-CAG-CAA-AAG-CAG-G-3') y MBTuni13 (5'-ACG-CGT-GAT-CAG-TAG-AAA-CAA-GG-3'), los cuales amplifican para el genoma de cualquier tipo de Influenza. Se trabajó con un total de diez muestras, cinco muestras directas y cinco muestras diluidas en la razón 1:20. Las muestras se rotularon como se visualiza en la tabla 4. Se realizaron dos mezclas para PCR, mezcla A para las muestras directas y mezcla B para las muestras diluidas indicadas en las tablas 5 y 6 respectivamente. Las condiciones para el termociclador están descritas en la tabla 7 y fueron las mismas para todas las muestras. Finalmente, los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 40 minutos para luego ser registrados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 5).

Tabla 4: Indexación de las muestras de filtro y membrana de osmosis para el PCR.

Nombre original de la muestra	O1	O2	F2	Control no RT	Control no templado
Muestras directas	i	ii	iii	iv	v
Muestras diluidas	id	iid	iiid	ivd	vd

Tabla 5: Mezcla para PCR de las muestras directas.

Mezcla A para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	17.25 ul
Buffer 5X	5 ul
dNTPs 10 uM	0.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	0.5 ul
MBTuni13 [10 uM]	0.5 ul
Polimerasa Phusion	0.25 ul
cDNA	1 ul
Volumen total	25 ul

Tabla 6: Mezcla para PCR de las muestras diluidas.

Mezcla B para PCR	X1
-------------------	----

H ₂ O libre de nucleasas	12.25 ul
Buffer 5X	5 ul
dNTPs 10 uM	0.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	0.5 ul
MBTuni13 [10 uM]	0.5 ul
Polimerasa Phusion	0.25 ul
cDNA	5 ul
Volumen total	25 ul

Tabla 7: Condiciones para PCR de las muestras directas y diluidas.

Temperatura	Tiempo	Cantidad de Ciclos
94° C	15 seg	5 ciclos
42° C	30 seg	
68° C	3 min 20 seg	
94° C	15 seg	35 ciclos
57° C	30 seg	
68° C	3min 20seg	
68° C	5 min	
4° C	Indefinido	Indefinido

3.2.2. Muestras de agua de humedal La Chimba

Recolección de la muestra

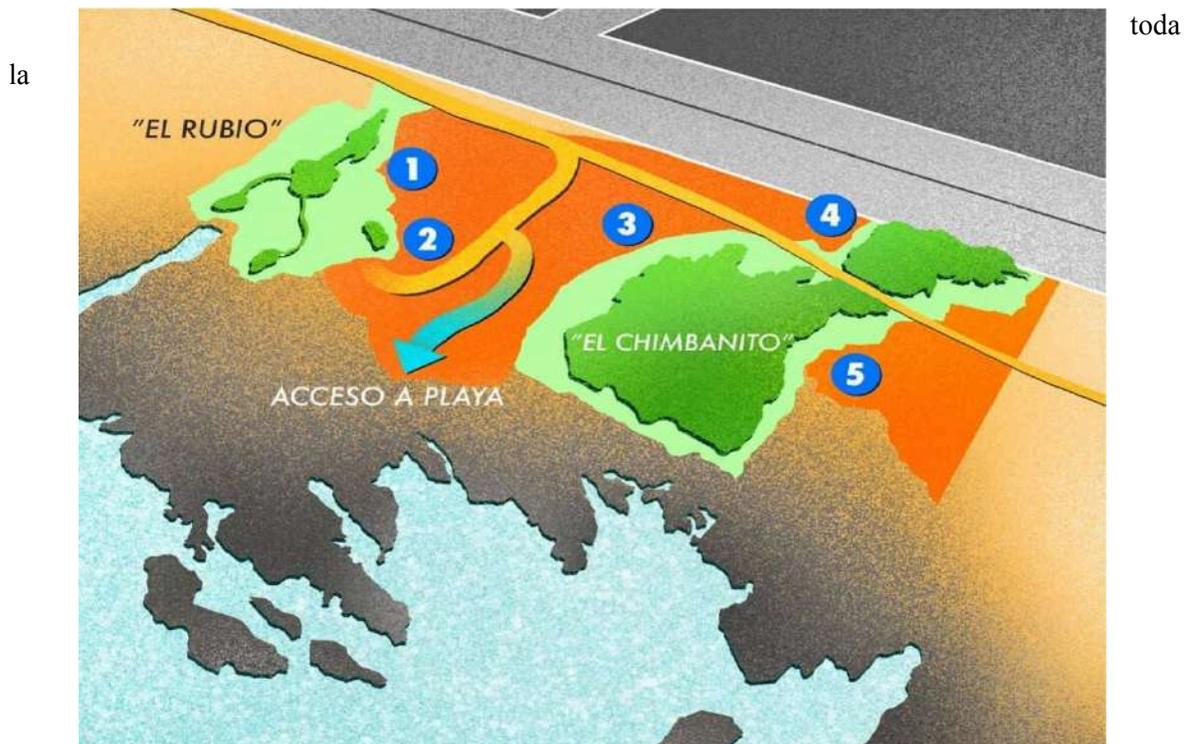
Las muestras se obtuvieron del humedal La Chimba, ubicado en la costa a 10 km al norte del centro de la ciudad. Este lugar cuenta con dos vertientes de agua, vegetación y es el hogar de diversas especies, por lo cual, es un lugar importante para muestrear ya que es una parada concurrida en las rutas de las aves migratorias.

Se tomaron cuatro muestras de agua del humedal La Chimba en botellones de 1 L. Se recolectaron dos muestras de la zona ‘El Rubio’, 1A y 1B; y dos muestras de la zona ‘El Chimbanito’, 2A y 2B. Estas muestras se guardaron posteriormente a 4°C hasta su respectivo análisis.

Figura 4: Mapa del humedal La Chimba.

Preparación de la muestra para la precipitación de virus desde muestras de agua.

Las muestras se trabajaron por duplicado. A 50 ml de muestra se le agregaron 50 µl de Sulfato de aluminio y potasio al 0.02% y 50 µl de Leche desnatada al 0.01%, y en caso de ser necesario se ajustó el pH a 6.5 - 7.0 con el hidróxido de sodio 1N. Luego las muestras se dejaron



toda

noche a temperatura ambiente para la precipitación y al otro día se centrifugaron a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C.

Extracción del material genético con trizol.

Se resuspendió el precipitado de las muestras anteriores con 1 ml de trizol y se transfirió a un tubo de 1.5 ml, al cual se le agregó 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló hasta emulsionar. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C y se transfirió la

fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 ml con ayuda de una micropipeta. Se agregó 0.5 µl de glycoblué a las muestras y 500 µl de isopropanol, y se dejó incubando por 10 minutos a 4°C. Las muestras se llevaron a centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue lavado con etanol al 75% y centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. El pellet resultante fue resuspendido con agua de biología molecular y se midió la concentración de ácidos nucleicos con el espectrofotómetro BioSpec-nano. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su respectivo análisis.

RT PCR de las muestras

Para la síntesis de ADN complementario de las muestras, se utilizó el LunaScript RT SuperMix Kit, siguiendo todos los pasos descritos en el protocolo del kit. Para el control positivo se utilizaron dos muestras positivas de influenza, una corresponde a H3 y la otra a H1, las cuales se procesaron con el mismo kit. Finalmente se obtuvieron un total de doce muestras, ocho muestras de agua y cuatro controles, dos controles positivos, un control no RT y un control No templado. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su respectivo uso.

PCR convencional de las muestras

Estas muestras se procesaron de la misma forma que las muestras de membrana de filtro y osmosis. Las muestras se rotularon como se muestra en la tabla 10 y se agregó un control negativo (agua). Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 6 y 7).

Tabla 10: Indexación de las muestras de agua de humedal para el PCR.

Nombre original de la muestra	Muestra directa	Muestra diluida
1A	1A	1Ad
1A.	1A.	1Ad.
1B	1B	1Bd
1B.	1B.	1Bd.
2A	2A	2Ad
2A.	2A.	2Ad.
2B	2B	2Bd
2B.	2B.	2Bd.
H1	H1	H1d
H3	H3	H3d

NO RT	NO RT	NO RTd
NO T	NO T	NO Td
Control negativo	H2O	H2Od

3.2.3. Estandarización de PCR con muestras positivas de Influenza

Muestras positivas de Influenza

Se utilizaron muestras de ARN total de pacientes confirmados con Influenza A, obtenidas desde el Laboratorio Clínico de la Universidad de Antofagasta. Se trabajó con cuatro muestras confirmadas para influenza como control positivo para la estandarización del PCR. Las primeras dos muestras corresponden a influenza H1 y H3, mientras que las otras dos muestras corresponden a Influenza A H1N1 pdm09 (312 y 316). A las cuatro muestras se les midió por medio de espectrofotometría la concentración de ácidos nucleicos.

RT PCR de las muestras positivas de influenza

Antes de realizar el RT PCR de las muestras, se midió la cantidad de material genético para los respectivos cálculos de reacción según protocolo (Tabla 10). Para la síntesis de ADN complementario de las muestras, se utilizó el LunaScript RT SuperMix Kit, siguiendo todos los pasos descritos en el protocolo del kit. Se trabajaron seis muestras en total, las cuatro muestras de influenza, H1, H3, 312 y 316 y los dos controles correspondientes, No RT y No templado. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su respectivo uso.

Estandarización de PCR con partidores para H5 y gen M con muestras H1 y H3

En esta ocasión se utilizaron los partidores RF1151 (5'-GGA-ACT-TAC-CAA-ATA-CTG-TCA-ATT-TAT-TCA-3') y RF1152 (5'-CCA-TAA-AGA-TAG-ACC-AGC-TAC-CAT-GA-3') para la región H5 de influenza y también se utilizaron los partidores RF1073 (5'-AAG-ACC-AAT-CCT-GTC-ACC-TCT-GA-3') y RF1074 (5'-CAA-AGC-GTC-TAC-GCT-GCA-GTC-C-3') que amplifican para el gen de la matriz (gen M). Se trabajó con un total de 10 muestras, 5 muestras con los partidores para H5 y 5 muestras con los partidores para el gen M. Las muestras se rotularon como se visualiza en la tabla 11. Al ser

fragmentos pequeños los que se buscaba amplificar, se usó la enzima Gotaq green master mix 2X y el mix para la reacción correspondiente es el mismo para ambos partidores como se indica en la tabla 12. Las condiciones para el termociclador están descritas en la tabla 13 y fueron las mismas para todas las muestras. Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel DocTM EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 8).

Tabla 11: Indexación de las muestras de H1 y H3 para PCR.

Nombre original de la muestra	H1	H3	H1d (diluida)	H3d (diluida)	Control negativo (Agua)
Partidores para H5	1	2	3	4	5
Partidores para gen M	6	7	8	9	10

Tabla 12: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con enzima Gotaq.

Mezcla para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	10 ul
Primer forward [10 uM]	0.25 ul
Primer reverse [10 uM]	0.25 ul
Gotaq green master mix 2X	12.5 ul
cDNA	2 ul
Volumen total	25 ul

Tabla 13: Condiciones para PCR de las muestras directas y diluidas.

Temperatura	Tiempo	Cantidad de Ciclos
95° C	10 min	1 ciclo
95° C	13 seg	35 ciclos
60° C	20 seg	
72° C	40 seg	
72° C	5 min	1 ciclo
4° C	Indefinido	Indefinido

Estandarización de PCR con partidores para MBTuni12 y MBTuni13 con muestras H1 y H3, utilizando distintas polimerasas

En esta oportunidad se trabajó con tres polimerasas diferentes, utilizando los partidores para amplificar el genoma completo de influenza MBTuni12 y MBTuni13 para las diferentes reacciones. Se aumentó la cantidad de cDNA a 5 uL en todas las reacciones y en la reacción de la enzima Gotaq, se aumentó la cantidad de partidores a 0.5 uL. Se trabajó un total de nueve muestras, las cuales están descritas en la tabla 14. Las distintas reacciones para sus respectivas enzimas se describen en la tabla 15, 16 y 17, mientras que las condiciones de PCR se describen en la tabla 18, siendo las mismas condiciones para los tres tipos de polimerasa. Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 9).

Tabla 14: Indexación de las muestras de H1 y H3 para PCR con diferentes polimerasas.

Enzima utilizada	H1	H3	Control negativo (Agua)
Gotaq green master mix 2X	GH1	GH3	G-
Polimerasa Phusion	PH1	PH3	P-
Paq Polimerasa	HH1	HH3	H-

Tabla 15: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Gotaq.

Mezcla para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	6.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	0.5 ul
MBTuni13 [10 uM]	0.5 ul
Gotaq green master mix 2X	12.5 ul
cDNA	5 ul
Volumen total	25 ul

Tabla 16: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Phusion.

Mezcla para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	13.25 ul
Buffer 5X	5 ul
dNTPs 10 uM	0.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	0.5 ul
MBTuni13 [10 uM]	0.5 ul
Polimerasa Phusion	0.25 ul
cDNA	5 ul
Volumen total	25 ul

Tabla 17: Mezcla para PCR de las muestras H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Paq polimerasa.

Mezcla para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	37.1 ul
10X Buffer	5 ul
dNTPs 10 uM	0.4 ul
MBTuni12 [10 uM]	1 ul
MBTuni13 [10 uM]	1 ul
Paq polimerasa	0.5 ul
cDNA	5 ul
Volumen total	50 ul

Tabla 18: Condiciones para PCR de las muestras H1 y H3 con distintas polimerasas.

Temperatura	Tiempo	Cantidad de Ciclos
94° C	30 seg	5 ciclos
45° C	30 seg	
68° C	3 min	
94° C	30 seg	31 ciclos
57° C	30 seg	
68° C	3 min	
4° C	Indefinido	Indefinido

Estandarización de PCR con partidores para MBTuni12 y MBTuni13 con muestras H1, H3, 312 y 316 utilizando los parámetros descritos en un paper

Se realizaron pequeños cambios en la metodología, utilizando como referencia lo descrito por (Diefenbacher et al., 2022). Se aumentó la cantidad de cDNA a 10 uL en la reacción, y también se aumentó la concentración final de los partidores. Se trabajó un total de cinco muestras, las cuales están descritas en la tabla 19. Se decidió continuar trabajando con la enzima Phusion, y los volúmenes de reacción están descritas en la tabla 20. Las condiciones de PCR están descritas en la tabla 21. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% e a 80 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 10).

Tabla 19: Indexación de las muestras de H1, H3, 312 y 316 para PCR con enzima Phusion.

Nombre original de la muestra	Como fue rotulada
H1	H1
H3	H3
312	312
316	316
Control negativo (Agua)	(-)

Tabla 20: Mezcla para PCR de las muestras H1, H3,312 y 316 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Phusion.

Mezcla para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	6.75 ul
Buffer 5X	5 ul
dNTPs 10 uM	0.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	1.25 ul
MBTuni13 [10 uM]	1.25 ul
Polimerasa Phusion	0.25 ul
cDNA	10 ul

Volumen total	25 ul
----------------------	-------

Tabla 21: Condiciones para PCR de las muestras H1, H3, 312 y 316 con enzima Phusion.

Temperatura	Tiempo	Cantidad de Ciclos
98° C	30 seg	1 ciclo
98° C	10 seg	35 ciclos
58° C	20 seg	
72° C	3 min	
72° C	10 min	1 ciclo
4° C	Indefinido	Indefinido

Estandarización de PCR con partidores MBTuni12 y MBTuni13 con muestras H1, H3, 312 y 316 utilizando los parámetros entregados por Thermo Fisher

Se introdujeron la secuencia de los partidores en la página de Thermo Fisher y se seleccionó la enzima Phusion para calcular la temperatura de alineamiento adecuada para el PCR, y gracias al resultado obtenido, se modificaron las condiciones de PCR como se indica en la tabla 22, mientras que los volúmenes de los reactivos para la reacción son los descritos anteriormente en la tabla 20. Se trabajó un total de cinco muestras, las cuales están rotuladas como se muestra en la tabla 19. Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 80 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 11).

Tabla 22: Condiciones para PCR de las muestras H1, H3, 312 y 316 con enzima Phusion, Thermo Fisher.

Temperatura	Tiempo	Cantidad de Ciclos
95° C	3 min	1 ciclo
95° C	30 seg	35 ciclos
65.8° C	30 seg	
68° C	3 min	
68° C	3 min	1 ciclo
4° C	Indefinido	Indefinido

Estandarización de PCR con partidores MBTuni12 y MBTuni13 con muestras 312 y 316, con aumento en la cantidad de partidores.

Se trabajó con la enzima Phusion, utilizando los partidores para amplificar el genoma completo de influenza MBTuni12 y MBTuni13, aumentando su concentración final en la reacción a 1uM. Se trabajó un total de tres muestras, las cuales están descritas en la tabla 23. La reacción se describe en la tabla 24, mientras que las condiciones de PCR se describen en la tabla 25, modificando la cantidad de ciclos a 40. Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 80 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 12).

Tabla 23: Indexación de las muestras de 312 y 316 para PCR con enzima Phusion.

Nombre original de la muestra	Como fue rotulada
312	312
316	316
Control negativo (Agua)	(-)

Tabla 24: Mezcla para PCR de las muestras 312 y 316 con partidores MBTuni12 y MBTuni13, enzima Phusion.

Mezcla para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	9.25 ul
Buffer 5X	5 ul
dNTPs 10 uM	0.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	2.5 ul
MBTuni13 [10 uM]	2.5 ul
Polimerasa Phusion	0.25 ul
cDNA	5 ul
Volumen total	25 ul

Tabla 25: Condiciones para PCR de las muestras 312 y 316 con enzima Phusion.

Temperatura	Tiempo	Cantidad de Ciclos
95° C	3 min	1 ciclo
95° C	30 seg	40 ciclos
65.8° C	30 seg	
68° C	3 min	
68° C	3 min	1 ciclo
4° C	Indefinido	Indefinido

Estandarización de PCR con partidores MBTuni12 y MBTuni13 sin muestras para visualizar la dimerización de partidores.

Para visualizar la dimerización de los partidores MBTuni12 y MBTuni13, se realizaron tres reacciones diferentes con los partidores a distintas concentraciones finales (0.2 uM, 0.5 uM y 1 uM) sin la adición de muestra a la reacción (Tabla 26). Se trabajó un total de tres muestras, las cuales están descritas en la tabla 27. Las condiciones de PCR son las descritas en la tabla 25. Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 80 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 13).

Tabla 26: Mezcla para PCR para visualizar la dimerización de los partidores MBTuni12 y MBTuni13.

Mezcla para PCR	X1 (0.2 uM)	X2 (0.5 uM)	X3 (1 uM)
H ₂ O libre de nucleasas	18.25 ul	16.75 ul	14.25 ul
Buffer 5X	5 ul	5 ul	5 ul
dNTPs 10 uM	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	0.5 ul	1.25 ul	2.5 ul
MBTuni13 [10 uM]	0.5 ul	1.25 ul	2.5 ul
Polimerasa Phusion	0.25 ul	0.25 ul	0.25 ul
Volumen total	25 ul	25 ul	25 ul

Tabla 27: Indexación de las reacciones para la dimerización de partidores.

Nombre de la reacción	Como fue rotulada
X1	0.2
X2	0.5
X3	1

3.2.4. PCR de las muestras de de filtros y membrana de osmosis; y muestras de agua de humedal.

Se repitió el PCR realizado a las muestras de filtro y membrana de osmosis, como también a las muestras de agua de humedal La Chimba, para hacer la comparativa respecto al primer PCR que se realizó a estas muestras. Se trabajaron nueve muestras en total, las cuales se rotularon como se describe en la tabla 28. La reacción de PCR se muestra en la tabla 29 y las condiciones de PCR son las descritas en la tabla 25. Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 80 V por 40 minutos para luego ser visualizados en el equipo Gel Doc™ EZ Imager con el software Image Lab 5.1 (Figura 14).

Tabla 28: Indexación de las muestras de membrana de filtro y osmosis, y muestras de agua de humedal para PCR con enzima Phusion.

Nombre original de la muestra	Como fue rotulada
Control positivo (Muestra influenza H1)	(+)
i (osmosis)	O1
ii (osmosis)	O2

iii (filtro)	F2
1A (humedal)	1A
1B (humedal)	1B
2A (humedal)	2A
2B (humedal)	2B
Control negativo (Agua)	(-)

Tabla 29: Mezcla para PCR de las muestras de membrana de filtro y osmosis, y muestras de agua de humedal La Chimba con enzima Phusion.

Mezcla para PCR	X1
H ₂ O libre de nucleasas	11.75 ul
Buffer 5X	5 ul
dNTPs 10 uM	0.5 ul
MBTuni12 [10 uM]	1.25 ul
MBTuni13 [10 uM]	1.25 ul
Polimerasa Phusion	0.25 ul
cDNA	5 ul
Volumen total	25 ul

4. Resultados

4.1. Muestras de filtro y membranas de osmosis de Aguas Antofagasta

Resultado de la purificación de ARN de las muestras de filtro y membranas de osmosis

Tabla 8. Resultados obtenidos con el espectrofotómetro BioSpec-nano.

Nombre de la muestra	ARN (ng/ul)	OD260/280	OD260/230

<u>O1</u>	<u>51.54</u>	<u>2.05</u>	<u>0.72</u>
<u>O2</u>	<u>36.20</u>	<u>2.12</u>	<u>0.79</u>
<u>F2</u>	<u>17.32</u>	<u>2.14</u>	<u>0.98</u>

Resultado de PCR de las muestras de filtro y membrana de osmosis visualizados en un gel de agarosa

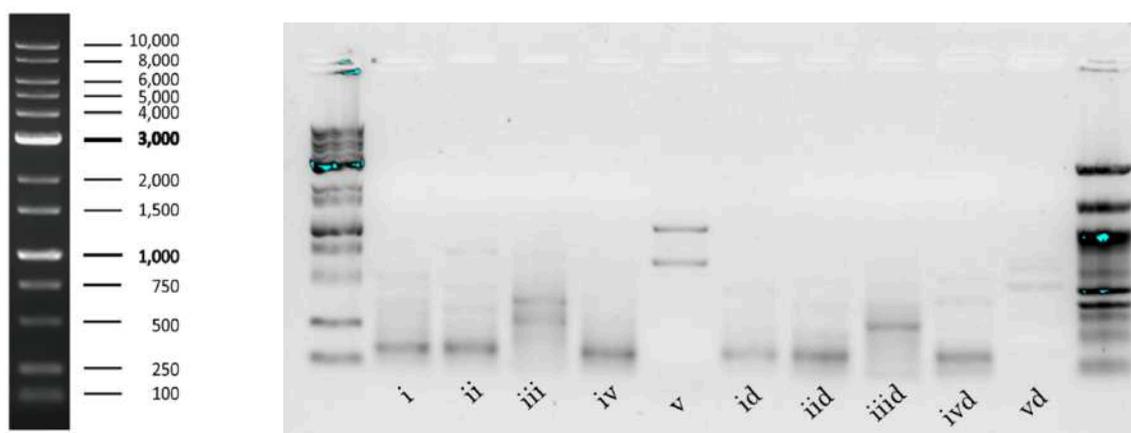


Figura 5: Electroforesis

en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de las muestras directas y diluidas de las membranas de filtro y osmosis. Las muestras i, ii, iii corresponden las muestras O1, O2 y F2 respectivamente, mientras que las muestras iv corresponde al control no RT y la muestra v al control no templado. Las muestras id, iid, iiid, ivd y vd corresponden a la dilución de las muestras anteriores.

4.2. Muestras de agua de humedal La Chimba

Resultado de la purificación de ARN de las muestras de agua de humedal la Chimba

Tabla 9. Resultados obtenidos con el espectrofotómetro BioSpec-nano.

Nombre de la muestra	ARN (ng/ul)	OD260/280	OD260/230
<u>1A</u>	<u>66.88</u>	<u>1.29</u>	<u>0.30</u>
<u>1A</u>	<u>1325.95</u>	<u>1.40</u>	<u>0.41</u>
<u>1B</u>	<u>1195.54</u>	<u>1.48</u>	<u>1.36</u>
<u>1B</u>	<u>345.79</u>	<u>1.17</u>	<u>1.21</u>

<u>2A</u>	<u>803.86</u>	<u>1.28</u>	<u>0.28</u>
<u>2A.</u>	<u>945.51</u>	<u>1.44</u>	<u>0.30</u>
<u>2B</u>	<u>335.69</u>	<u>1.27</u>	<u>0.22</u>
<u>2B.</u>	<u>395.53</u>	<u>1.30</u>	<u>1.17</u>

Resultado de PCR de las muestras de agua de Humedal La Chimba visualizados en un gel de agarosa

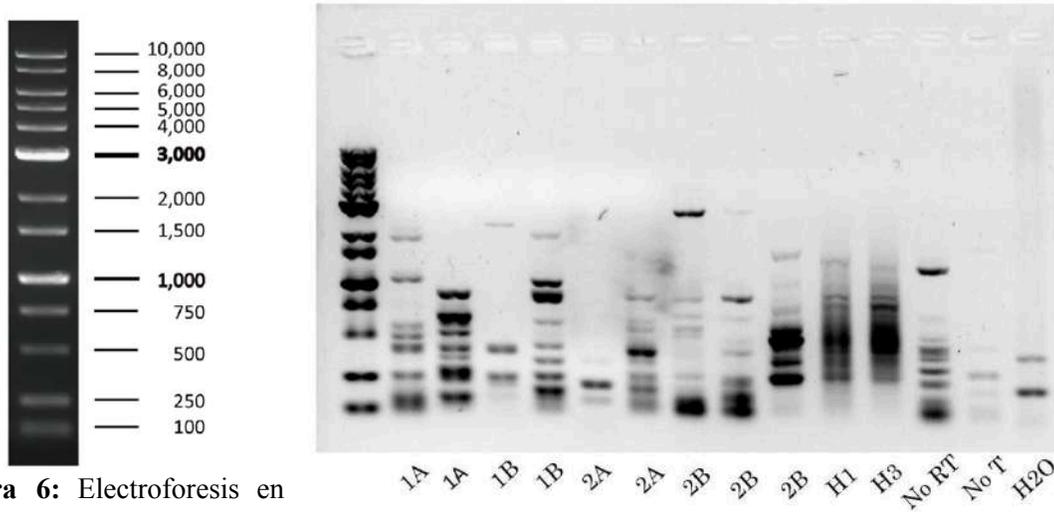


Figura 6: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos PCR de las muestras directas de agua de Humedal La Chimba. Las muestras se trabajaron por duplicado, 1A y 1B corresponden a las muestras tomadas en la zona ‘El Rubio’ del Humedal La Chimba, y las muestras 2A y 2B corresponden a las muestras tomadas en la zona ‘El Chimbanito’. H1 y H3 son los controles positivos, mientras que los controles negativos son No RT, No T (no templado) y H2O (agua).

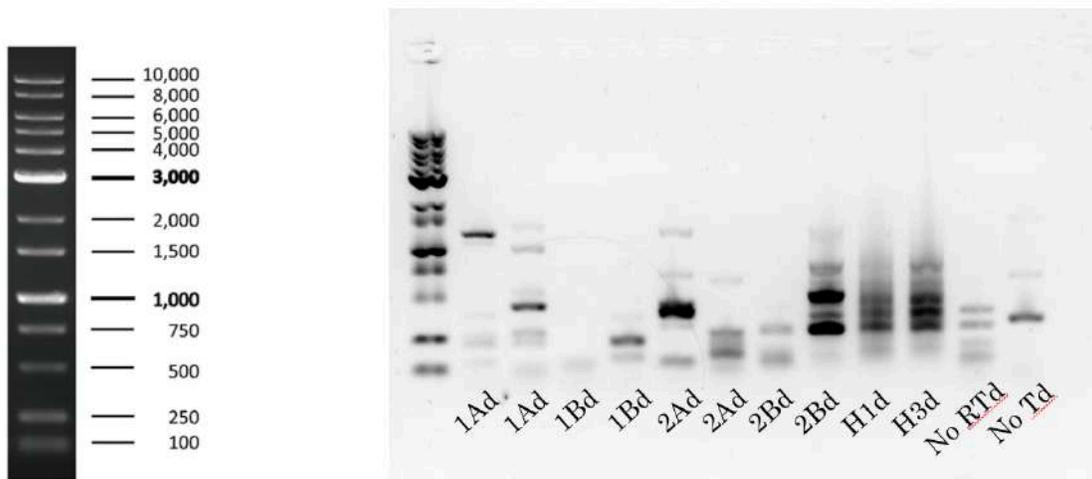


Figura 7: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de las muestras diluidas de agua de Humedal La Chimba. Las muestras se trabajaron por duplicado, 1Ad y 1Bd corresponden a la dilución de las muestras tomadas en la zona ‘El Rubio’ del Humedal La Chimba, y las muestras 2Ad y 2Bd corresponden a la dilución de las muestras tomadas en la zona ‘El Chimbanito’. H1d y H3d son la dilución de los controles positivos, mientras que la dilución de los controles negativos son No RTd y No Td (no templado).

4.3. Estandarización de PCR con muestras positivas de Influenza

Resultado de la concentración de ARN de las muestras de influenza positivas.

Tabla 30: Concentraciones de las muestras de Influenza positivas obtenidas con el espectrofotómetro BioSpec-nano.

<u>Nombre de la muestra</u>	<u>ARN (ng/ul)</u>	<u>OD260/280</u>	<u>OD260/230</u>
H1	74.27	2.00	0.34
H3	15.79	2.11	0.64
312	10.21	2.36	0.48
316	5.39	1.80	0.35

Resultado estandarización de PCR con partidores para H5 y gen M con muestras H1 y H3

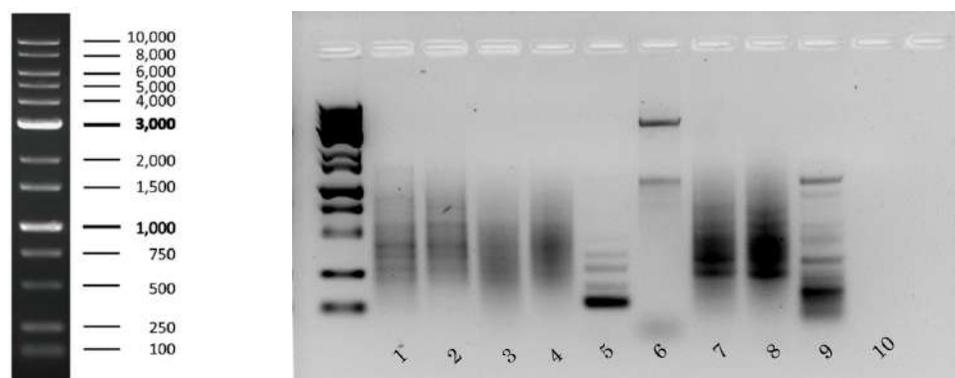


Figura 8: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1 y H3 con partidores para H5 y gen M. Las muestras 1, 2, 3, 4 y 5

fueron trabajadas con los partidores para H5, donde 1 corresponde a H1, 2 corresponde a H3, 3 corresponde a la dilución de H1, 4 corresponde a la dilución de H3 y 5 corresponde al control negativo. Las muestras 6, 7, 8, 9 y 10 fueron trabajadas con los partidores para el gen M, donde 6 corresponde a H1, 7 corresponde a H3, 8 corresponde a la dilución de H1, 9 corresponde a la dilución de H3 y 10 corresponde al control negativo.

Resultados estandarización de PCR con partidores para MBTuni12 y MBTuni13 con muestras H1 y H3, utilizando distintas polimerasas

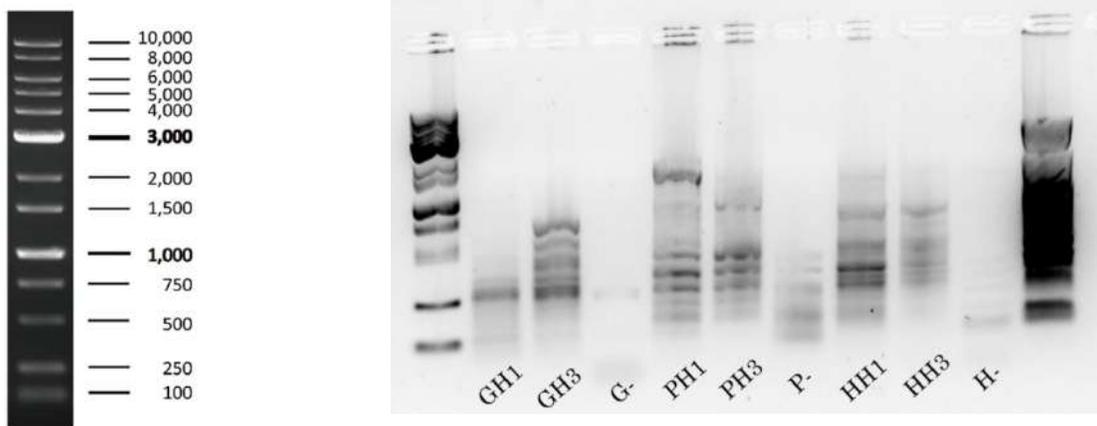


Figura 9: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1 y H3 con partidores MBTuni12 y MBTuni13. Las muestras GH1, GH3 y G- fueron trabajadas con la enzima Gotaq green master mix y corresponden a las muestras H1, H3 y control negativo respectivamente. Las muestras PH1, PH3 y P- fueron trabajadas con la enzima Phusion y corresponden a las muestras H1, H3 y control negativo respectivamente. Por último, las muestras HH1, HH3 y H- fueron trabajadas con la enzima Paq polimerasa y corresponden a las muestras H1, H3 y control negativo respectivamente.

Resultados estandarización de PCR con partidores para MBTuni12 y MBTuni13 con muestras H1, H3, 312 y 316 utilizando los parámetros descritos en un paper

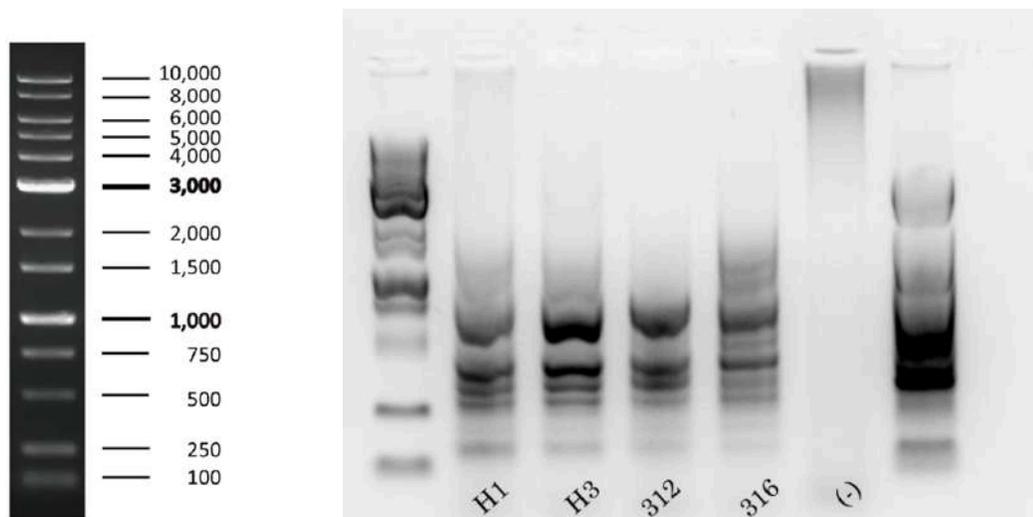


Figura 10: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1, H3, 312, 316 y (-) que corresponde al control negativo con partidores MBTuni12 y MBTuni13, utilizando parámetros descritos en un paper.

Resultados estandarización de PCR con partidores para MBTuni12 y MBTuni13 con muestras H1, H3, 312 y 316 utilizando los parámetros entregados por Thermo Fisher

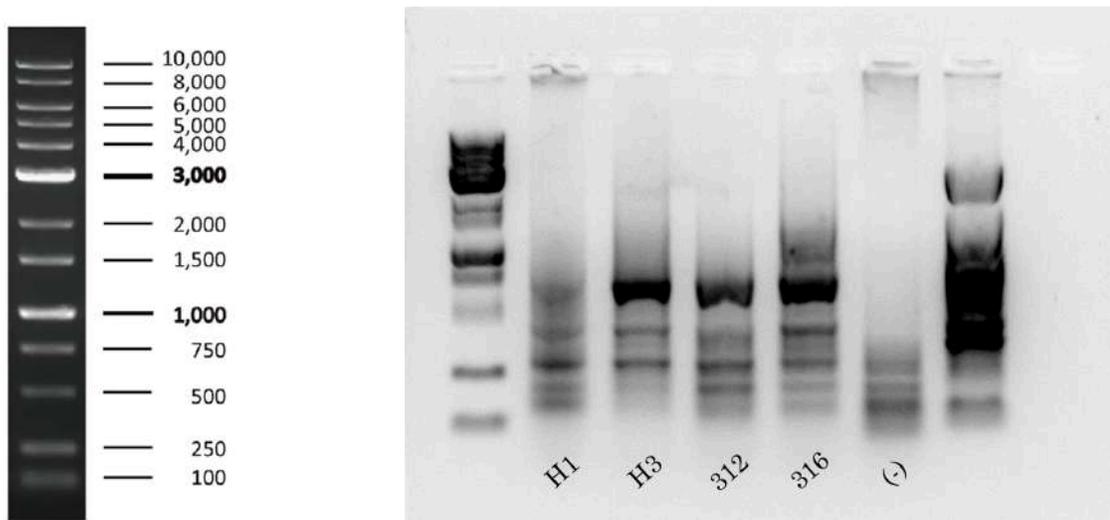


Figura 11: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de las muestras positivas de influenza H1, H3, 312, 316 y (-) que corresponde al control negativo con partidores MBTuni12 y MBTuni13, utilizando parámetros descritos entregados por Thermo Fisher.

Resultado estandarización de PCR con partidores MBTuni12 y MBTuni13 con muestras 312 y 316, con aumento en la cantidad de primers.

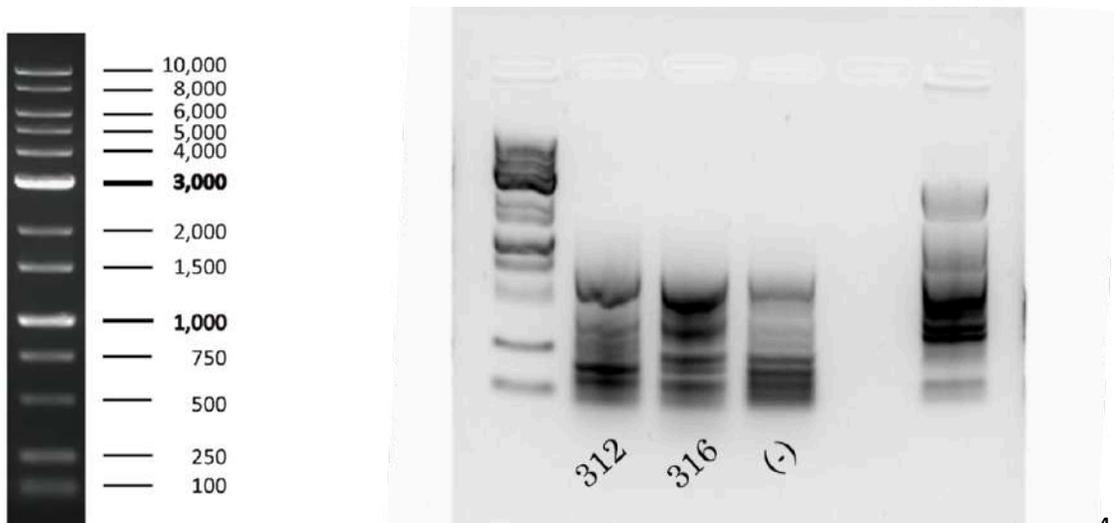


Figura 12: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de las muestras positivas de influenza 312, 316 y (-) que corresponde al control negativo con partidores MBTuni12 y MBTuni13, con aumento en la cantidad de partidores.

Resultados estandarización de PCR con partidores MBTuni12 y MBTuni13 sin muestras para visualizar la dimerización de partidores.

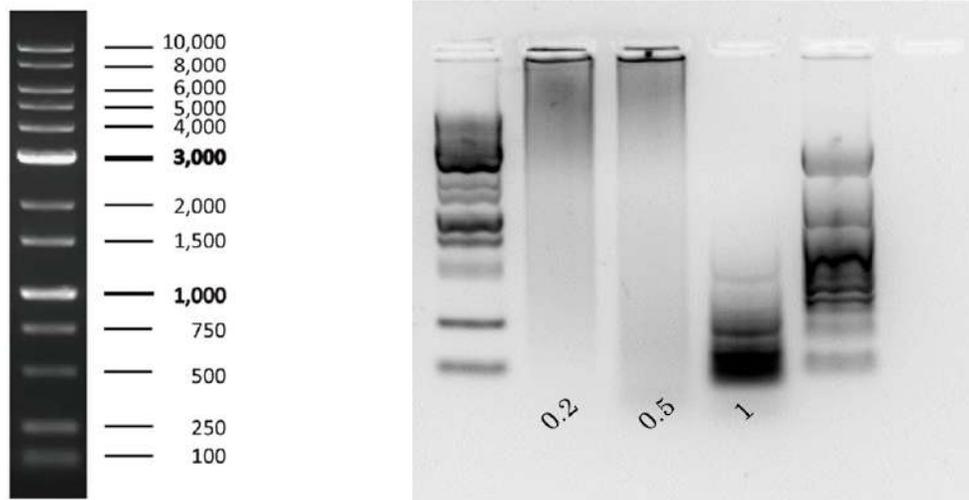


Figura 13: Electroforesis en matriz de agarosa donde se visualizan los productos de PCR de la dimerización de los partidores MBTuni12 y MBTuni13 a distintas concentraciones finales dentro de la reacción. Las muestras 0.2, 0.5 y 1 corresponden a la reacción de PCR con concentración final de partidores de 0.2 mM, 0.5 mM y 1mM respectivamente.

Resultado del PCR de las muestras de membrana de filtros y osmosis; y muestras de agua de humedal.

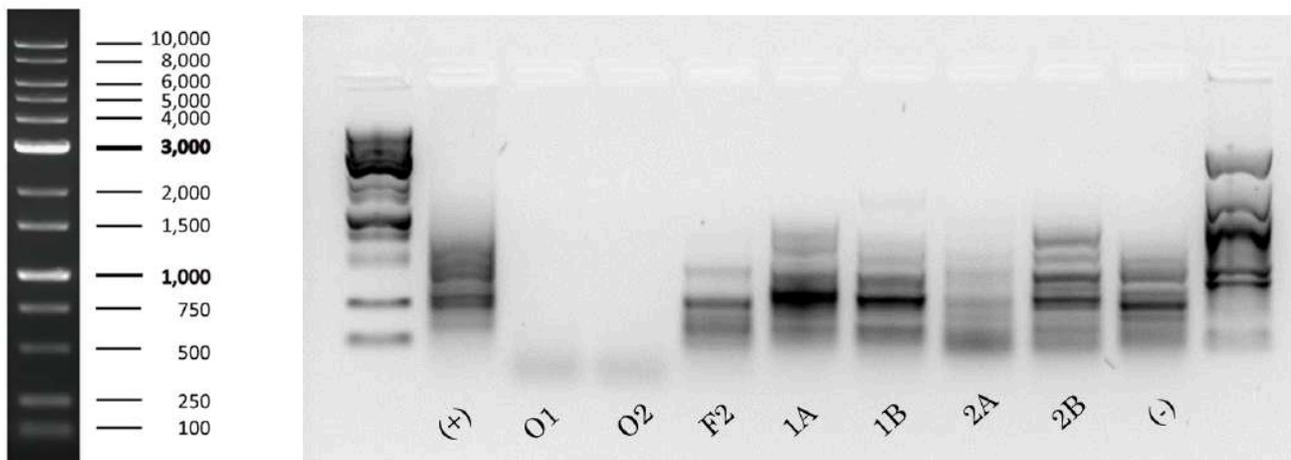


Figura 14: Electroforesis en matriz de agarosa donde se muestran las muestras de filtros y membrana de osmosis; y muestras de agua de humedal con las condiciones de PCR estandarizadas. El control positivo corresponde a la muestra H1, O1 y O2 son las muestras de membrana de osmosis mientras que F2 corresponde a la muestra de filtro. 1A, 1B, 2A y 2B son las muestras de agua tomadas en el Humedal La Chimba y el control negativo es agua.

5. Discusión

Los ácidos nucleicos son moléculas ácidas de carga negativa, y para su estudio es necesario que se aíse de otros componentes celulares como proteínas o lípidos. Para esto es necesario hacer una cuantificación de ácidos nucleicos, y entre los métodos más utilizados está la espectrofotometría. El ADN o ARN presentan una absorción máxima de luz a una longitud de 260 nm, las proteínas absorben luz a una longitud de 280 nm y los componentes fenólicos o sales tienen una absorbancia de 230 nm. Es por esto que, para validar la pureza del ADN o ARN, se divide la densidad óptica (OD) obtenida para la muestra de material genético por la OD de interés. Para el ARN un OD 260/280 se considera optimo cuando su valor es cercano o igual a 2.0, y un OD 260/230 se considera optimo cuando su valor varía entre 2.0 - 2.2, y en ambos casos, si las relaciones son menores, es porque hay presencia de contaminantes (Salazar Montes et al., 2013).

Respecto a los resultados obtenidos, al hacer el análisis de la tabla 8, donde se muestran la concentración de ARN obtenido de las muestras de membranas de filtro y osmosis tras la purificación de material genético y también muestra los valores para OD260/280 y 260/230,

podemos ver que a pesar de haber obtenido concentraciones de ARN relativamente bajas, no hay gran contaminación con proteínas ya que todos los valores de la relación OD260/280 son cercanos a 2.0, pero si hay contaminación por compuestos fenólicos o sales ya que los valores de la relación OD260/230 están alejados del rango óptimo.

En el caso de los resultados obtenidos para la purificación de ARN en las muestras de agua de humedal (tabla 9), las concentraciones de material genético son altas a excepción de la muestra 1A, pero a diferencia de la purificación de ARN de las muestras de membrana de filtros y osmosis, la relación OD260/280 muestra que hay presencia de contaminación por proteínas, al igual la relación OD260/230 muestra contaminación por compuestos fenólicos o sales.

Esta diferencia entre la purificación de las muestras de membranas y las de agua, podría deberse a diversos factores. El primero podría ser porque ambas muestras fueron tratadas de forma diferente para la purificación. Las muestras de membrana de filtros y osmosis fueron tratadas con un kit comercial mientras que las muestras de agua de humedal fueron tratadas por el método de precipitación por Trizol, por lo que quizás fue necesario haber realizado una segunda purificación de ARN o hacer un segundo lavado con etanol para eliminar de forma adecuada los compuestos fenólicos restantes. El otro factor podría deberse a que las muestras de agua de humedal son muestras ambientales, y contienen todo tipo de microorganismos o contaminantes, lo que las hace más complejas a la hora de trabajar.

Los partidores MBTuni12 y MBTuni13 son partidores capaces de amplificar todo el genoma de influenza tipo A por sus extremos conservados. Al realizar la PCR deberían visualizarse 8 segmentos de influenza, los cuales corresponden a NS (0.9 kb), M (1.0 kb), NA (1.4 kb), NP (1.6 kb) HA (1.8 kb), PA (2.2 kb), PB1 (2.3 kb) y PB2 (2.3 kb). Esto se puede apreciar visualmente en la figura 15, la cual nos muestra el genoma de referencia de Influenza tipo A de origen animal (Zhou et al., 2009).

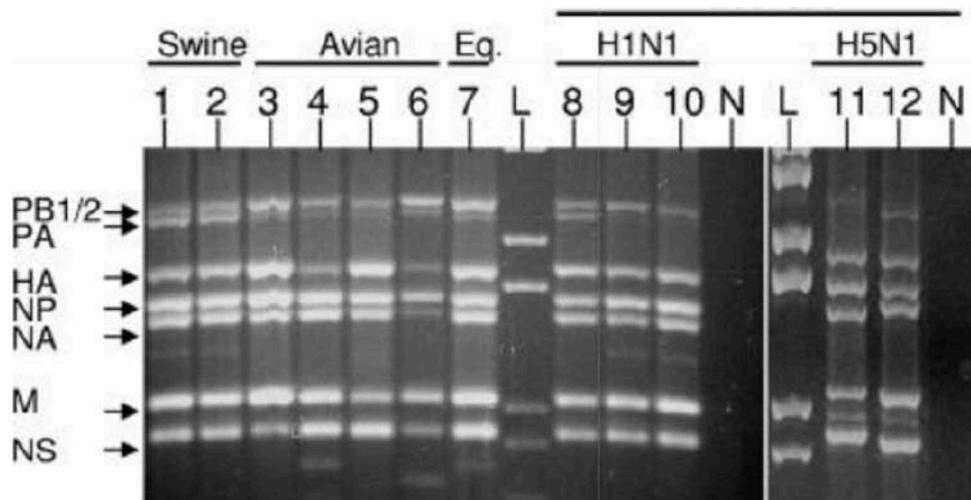


Figura 15: Imagen referencial del genoma de influenza A.

Al analizar los resultados obtenidos de todos los productos de PCR corridos en los distintos geles, notamos que absolutamente ningún gel se ve como en la imagen de referencia, esto puede deberse a diversos factores, entre los cuales podemos encontrar: El diseño o elección de los cebadores, la cantidad de ADN utilizada no tiene relevancia, la concentración de los cebadores no es la adecuada, la calidad del ADN y el programa de amplificación del termociclador (Méndez et al., 2004). Aun así, en algunos geles se puede visualizar bandas que podrían corresponder a los segmentos de interés, como se muestra en la figura 6, donde las muestras 1A, 1B, H1 y H3 muestran bandas de 1.0 kb aproximadamente, por lo cual podría tratarse del segmento M. En la misma figura, hay muestras que muestran bandas entre los 1.5 kb a 2.0 kb, por lo que podría tratarse del segmento NA, NP o HA. En la figura 8, se utilizaron partidores para H5 y el gen M en muestras positivas de Influenza. Los partidores para H5 no debieron amplificar ya que son partidores específicos para ese linaje de influenza, pero los partidores para el gen M debían mostrar una amplificación de una banda de 1.0 kb, la cual se puede observar claramente en la muestra 6 y 9.

Por otro lado, también se puede observar una amplificación en los controles negativos utilizados. Esas amplificaciones pueden deberse a dímeros formado por los mismos cebadores. Es por ello que se decidió realizar un PCR sin muestra y con distintas concentraciones de partidores, para ver si a mayor concentración se encontraban bandas más marcadas, lo que puede confirmarse en la figura 13. Complementario a ello, se introdujeron las secuencias de los partidores MBTuni12 y MBTuni13 a la página IDT DNA para hacer un análisis de estos partidores, y se confirmó que el

primer MBTuni12 es capaz de formar dímeros, lo que podría interferir en el PCR y bajar la efectividad de la polimerasa.

La baja eficiencia obtenida en la amplificación de las muestras tanto ambientales como las muestras de influenza positivas puede deberse a factores que requieren optimización, como las concentraciones empleadas en las reacciones de PCR, las condiciones de PCR o el volumen de muestra a utilizar. Si bien se utilizaron condiciones estándar reportadas por otros autores (Diefenbacher et al., 2022), es posible que para el tipo de muestras ambientales utilizadas en este trabajo requiera de ajustes en los parámetros.

Al comparar los resultados obtenidos con otros estudios de detección de influenza aviar en muestras de agua, se observa que también hay reportes de una amplificación ineficiente. Según el trabajo publicado por (Hénaux et al., 2012), obtuvieron una baja tasa de detección del virus en muestras de agua ambiental provenientes de un lago, lo cual se le atribuye a la posible degradación del material genético.

Para mejorar la sensibilidad de la técnica de detección por medio de PCR, se podría probar el uso de distintos partidores como aquellos que amplifican para el gen M, ya que es una secuencia altamente conservada entre distintas cepas de influenza (Krauss, 2004). Los partidores MBTuni12 y MBTuni13 al amplificar toda la longitud del genoma, podrían ser propensos a la inhibición y a la inespecificidad.

Otra de las razones por la cual no hay amplificación en las muestras de agua como se esperaba, es por la calidad de la muestra, ya que hay sustancias presentes en las muestras de agua ambientales capaces de inhibir la PCR. Estas sustancias son aquellas que posean grupos fenólicos libres, los cuales tienen la capacidad de oxidarse para formar quinonas que inactivan la polimerasa, bajando su eficiencia (Poma et al., 2012). Esto, es muy posible analizando la relación OD260/230 de todas las muestras trabajadas, ya que los resultados indican una clara contaminación por compuestos fenólicos y sales.

Finalmente, podrían implementarse extracciones de material genético de las muestras ambientales con nuevos kits comerciales específicos para este tipo de muestras o la incorporación de controles internos para la amplificación. Otra opción también podría ser implementar el uso de PCR en tiempo real para la detección del virus, ya que esta técnica permitiría una cuantificación más sensible y precisa de los segmentos amplificados (Fereidouni et al., 2010)

6. Conclusiones

Se logró hacer el muestreo en zonas estratégicas de Antofagasta como lo es el humedal La Chimba gracias a la colaboración con la fundación Kennedy. Este humedal es un lugar muy concurrido por aves migratorias que tienen constante contacto con el lugar y los diferentes organismos y microorganismos que habitan allí.

Se logró concentrar y precipitar virus y purificar material genético desde muestras de agua, obteniendo muy buenas concentraciones de ácidos nucleicos. Sin embargo, es necesario optimizar este proceso para disminuir la contaminación por compuestos que pudiesen inhibir la PCR.

A pesar de los diversos ensayos realizados, aún no se han encontrado las condiciones óptimas para la detección del virus de la influenza aviar por medio de PCR, por ello es necesario continuar con los experimentos para encontrar las concentraciones de reactivos adecuadas, y condiciones de PCR en el termociclador.

Si bien aún no se logra estandarizar un protocolo para la detección de influenza aviar en muestras ambientales, este trabajo permitió sentar las bases metodológicas e identificar los principales desafíos para el análisis de las muestras ambientales. La estandarización de este protocolo seguirá siendo objetivo de investigación, ya que es crucial para lograr una vigilancia efectiva de este virus y poder prevenir potenciales brotes pandémicos.

7. Referencias bibliográficas

Akanbi, O. B., & Taiwo, V. O. (2014). Mortality and Pathology Associated with Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Outbreaks in Commercial Poultry Production Systems in Nigeria. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/415418>

Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. In *Nature Medicine* (Vol. 26, Issue 4, pp. 450–452). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>

Calvo, Á., Gimenez, F., & Feo, L. (2009). *INFLUENZA AVIAR: ASPECTOS GENERALES Y ACTUALIZACIÓN* (Vol. 13). <http://web.scidev.net>

Capua, I., & Marangon, S. (2006). *Control of Avian Influenza in Poultry*.

Casillas, S., Herrero, S., & Varon, J. (2007). *Gripe aviar: lo que un intensivista debe conocer*.

Dhama, K., Chakraborty, S., & Tiwari, R. (2013). *Avian/Bird Flu Virus: Poultry Pathogen Having Zoonotic and Pandemic Threats: A Review*.

Diefenbacher, M., Tan, T. J. C., Bauer, D. L. V., Stadtmueller, B. M., Wu, N. C., & Brooke, C. B. (2022). Interactions between Influenza A Virus Nucleoprotein and Gene Segment Untranslated Regions Facilitate Selective Modulation of Viral Gene Expression. *Journal of Virology*, 96(10). <https://doi.org/10.1128/jvi.00205-22>

Dixon, J. R. (1999). The International Conference on Harmonization Good Clinical Practice guideline. *Quality Assurance (San Diego, Calif)*, 6(2), 65–74. <https://doi.org/10.1080/105294199277860>

De la Vega, Francisca. (2023). Gripe aviar: Especialista analiza riesgo de un desastre ecológico y amenaza a la seguridad alimentaria [En línea]. <https://uchile.cl/noticias/202938/hay-riesgo-de-un-desastre-ecologico-por-la-gripe-aviar> [Consulta: 16 de Abril de 2023].

Fereidouni, S. R., Grund, C., Häuslaigner, R., Lange, E., Wilking, H., Harder, T. C., Beer, M., & Starick, E. (2010). Dynamics of specific antibody responses induced in mallards after infection by or immunization with low pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Diseases*, 54(1), 79–85. <https://doi.org/10.1637/9005-073109-Reg.1>

Fonseca, M. H. G., de Souza, T. de F. G., de Carvalho Araújo, F. M., & de Andrade, L. O. M. (2022). Dynamics of antibody response to CoronaVac vaccine. *Journal of Medical Virology*, 94(5), 2139–2148. <https://doi.org/10.1002/jmv.27604>

Franco, O., Romero, R., Morales Blanhir, J. E., Franco, T. O., De Jesús, M., Rosas Romero, R., & Morales Blanhir, J. E. (2007). *El cuadro clínico y laboratorio* (Vol. 66, Issue S1).

Gauthier-Clerc, M., Lebarbenchon, C., & Thomas, F. (2007). Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: a critical review. In *Ibis* (Vol. 149).

Godoy, P. (2006). *Pandemia de gripe aviar: un nuevo desafío para la salud pública*.

Gobierno de Chile. (2023). Primer caso de gripe aviar en planta industrial: SAG suspende exportaciones de carne de ave [En línea]. <https://www.gob.cl/noticias/primer-caso-gripe-aviar-plantel-industrial-sag-suspende-exportaciones-carne-ave/> [Consulta: 16 de Abril de 2023]

Griffin MR, Monto AS, Belongia EA, et al. Effectiveness of Non-Adjuvanted Pandemic Influenza A Vaccines for Preventing Pandemic Influenza Acute Respiratory Illness Visits in 4 U . S . Communities. 2011; 6: 4–10.

Hatchette, T. F., Walker, D., Johnson, C., Baker, A., Pryor, S. P., & Webster, R. G. (2004). Influenza A viruses in feral Canadian ducks: Extensive reassortment in nature. *Journal of General Virology*, 85(8), 2327–2337. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79878-0>

Hénaux, V., Samuel, M. D., Dusek, R. J., Fleskes, J. P., & Ip, H. S. (2012). Presence of avian influenza viruses in waterfowl and wetlands during summer 2010 in California: Are resident birds a potential reservoir? *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031471>

Herrero, libia. (2008). *Revisión El virus influenza y la gripe aviar (Influenza virus and avian flu) Acta Médica Costarricense*, ©2008 Colegio de Médicos y Cirujanos Resumen.

Holmes, E. C., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Robertson, D. L., Crits-Christoph, A., Wertheim, J. O., Anthony, S. J., Barclay, W. S., Boni, M. F., Doherty, P. C., Farrar, J., Geoghegan, J. L., Jiang, X., Leibowitz, J. L., Neil, S. J. D., Skern, T., Weiss, S. R., Worobey, M., Andersen, K. G., ... Rambaut, A. (2021). The origins of SARS-CoV-2: A critical review. In *Cell* (Vol. 184, Issue 19, pp. 4848–4856). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>

Jang, H., Boltz, D., Sturm-Ramirez, K., Shepherd, K. R., Jiao, Y., Webster, R., & Smeyne, R. J. (2009). *Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration*. www.pnas.org/cgi/content/full/

Jin, L., Li, Z., Zhang, X., Li, J., & Zhu, F. (2022). CoronaVac: A review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against SARS-CoV-2. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 18, Issue 6). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2096970>

Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *Fields Virology, 6th Edition*. <http://booksmedicos.org>

- Krauss, S. (2004). *Influenza A Viruses of Migrating Wild Aquatic Birds in North America*.
- Liem, N. T. (2005). *Lack of H5N1 Avian Influenza Transmission to Hospital Employees, Hanoi, 2004*.
- Lycett, S. J., Duchatel, F., & Digard, P. (2019). A brief history of bird flu. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 374, Issue 1775). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0257>
- Malik, Y. S., Kumar, N., Sircar, S., Kaushik, R., Bhat, S., Dhama, K., Gupta, P., Goyal, K., Singh, M. P., Ghoshal, U., El Zowalaty, M. E., Vinodhkumar, O. R., Yattoo, M. I., Tiwari, R., Pathak, M., Patel, S. K., Sah, R., Rodriguez-Morales, A. J., Ganesh, B., ... Singh, R. K. (2020). Coronavirus disease pandemic (Covid-19): Challenges and a global perspective. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 7, pp. 1–31). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070519>
- Manual Terrestre de la OMSA (2021). *Influenza Aviar (Incluida la infección por los virus de la Influenza Aviar altamente patógenos)*.
- Martínez, N. (2021). La producción y el flujo del conocimiento en la carrera internacional por las vacunas de COVID-19. *Foro Internacional*, 47–102. <https://doi.org/10.24201/fi.v62i1.2879>
- Méndez, S., & Pérez, E. (2004). *FORMACIÓN MÉDICA CONTINUADA La PCR múltiple en microbiología clínica Multiplex PCR in clinical microbiology*.
- MINSAL. (2023). MINSAL informa primer caso humano de gripe aviar en Chile [En línea]. <https://www.minsal.cl/minsal-informa-primer-caso-humano-de-gripe-aviar-en-chile/> [Consulta: 16 de Abril de 2023].
- Nauta J. *Statistics in Clinical and Observational Vaccine Studies*. 2020.
- Nurzijah, I., Elbohy, O. A., Kanyuka, K., Daly, J. M., & Dunham, S. (2022). Development of Plant-Based Vaccines for Prevention of Avian Influenza and Newcastle Disease in Poultry. In *Vaccines* (Vol. 10, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030478>
- OMS. (2023a). *Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO*.
- OMS. (2023b). *Human infection with avian influenza A(H5) viruses Human infection with avian influenza A(H5N1) virus*.

OMS OPS. (2022). *Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Brotes de Influenza Aviar y las implicaciones para la salud pública en la Región de las Américas*. www.paho.org

Organización Mundial de la Salud. (2023). Infección humana por el virus de la gripe aviar A (H5) – Chile [En línea]. <https://www.who.int/es/emergencias/disease-outbreak-news/item/2023-DON453> [Consulta: 16 de Abril 2023].

Organización mundial de la salud. (2023). Surveillance-Avian influenza [En línea]. <https://www.who.int/westernpacific/emergencias/surveillance/avian-influenza> [Consulta: el 16 de Abril de 2023].

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). Influenza Aviar [En línea]. <https://www.woah.org/es/enfermedad/influenza-aviar/> [Consulta: 16 de Abril de 2023].

Organización panamericana de la salud. (2023). Influenza Aviar [En línea]. <https://www.paho.org/es/temas/influenza-aviar> [Consulta: el 16 de Abril de 2023].

Pantin, M. J., & Swayne, D. E. (2007). Pathobiology of asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks. *Avian Diseases*, 51(SUPPL. 1), 250–259. <https://doi.org/10.1637/7710-090606r.1>

Rupani, P. F., Nilashi, M., Abumalloh, R. A., Asadi, S., Samad, S., & Wang, S. (2020). Coronavirus pandemic (COVID-19) and its natural environmental impacts. In *International Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 17, Issue 11, pp. 4655–4666). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02910-x>

SAG. (2023a). *INFORME SEMANAL_10 al_17_2023_V2*.

SAG. (2023b). *PLAN DE CONTINGENCIA Influenza Aviar PLAN DE CONTINGENCIA INFLUENZA AVIAR (IA) Servicio Agrícola y Ganadero, Departamento de Sanidad Animal 2 Contenido*.

Salazar Montes, Adriana., Sandoval Rodríguez, Ana., & Armendáriz Borunda, Juan. (2013). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana.

Servicio Agrícola y Ganadero. (2023). *RESOLUCIÓN EXENTA N°: 7192/2022 DECLARA EMERGENCIA ZOOSANITARIA Y ACTIVA SISTEMA NACIONAL DE EMERGENCIA DEL*

<https://ceropapel.sag.gob.cl/validar/?key=130695410&hash=2b4a5>

Servicio Agrícola y Ganadero. (2023). Influenza Aviar [En línea]. <https://www.sag.gob.cl/ia> [Consulta: 01 de Agosto de 2023].

SERNAPESCA. (2023). Influenza Aviar [En línea]. <http://www.sernapesca.cl/influenza-aviar> [Consulta: 16 de Abril de 2023].

Shane, S. M. (2005). *HANDBOOK ON POULTRY DISEASES*.

Skowronski DM, Janjua NZ, De Serres G, et al. Interim estimates of influenza vaccine effectiveness in 2012/13 from Canada's sentinel surveillance network, January 2013. *Eurosurveillance* 2013; 18: 1–10

Soto, J. A., Melo-González, F., Gutierrez-Vera, C., Schultz, B. M., Berríos-Rojas, R. V., Rivera-Pérez, D., Piña-Iturbe, A., Hoppe-Elsholz, G., Duarte, L. F., Vázquez, Y., Moreno-Tapia, D., Ríos, M., Palacios, P. A., Garcia-Betancourt, R., Santibañez, Á., Pacheco, G. A., Mendez, C., Andrade, C. A., Silva, P. H., ... Kalergis, A. M. (2022). Inactivated Vaccine-Induced SARS-CoV-2 Variant-Specific Immunity in Children. *MBio*, 13(6). <https://doi.org/10.1128/mbio.01311-22>

Storsaeter J, Olin-I- P, Hallander H. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. 1998; 16: 1907–16.

Swayne, D. E. (2007). Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Diseases*, 51(SUPPL. 1), 242–249. <https://doi.org/10.1637/7763-110706-regr.1>

Treanor JJ, Talbot HK, Ohmit SE, et al. Effectiveness of seasonal influenza vaccines in the United States during a season with circulation of all three vaccine strains. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 951–9.

Urbiztondo, L., Borràs, E., & Mirada, G. (2020). Coronavirus vaccines. *Vacunas*, 21(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2020.04.002>

Vijayanathan, A., & Nawawi, O. (2008). The importance of Good Clinical Practice guidelines and its role in clinical trials. In *Biomedical Imaging and Intervention Journal* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.2349/bij.4.1.e5>

White, M. C., & Lowen, A. C. (2018). Implications of segment mismatch for influenza A virus evolution. In *Journal of General Virology* (Vol. 99, Issue 1, pp. 3–16). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000989>

World Health Organization. Correlates of vaccine-induced protection: methods and implications. Initiative Vaccine Res Dep Immunization, *Vaccines Biol* 2013; WHO/IVB/13.

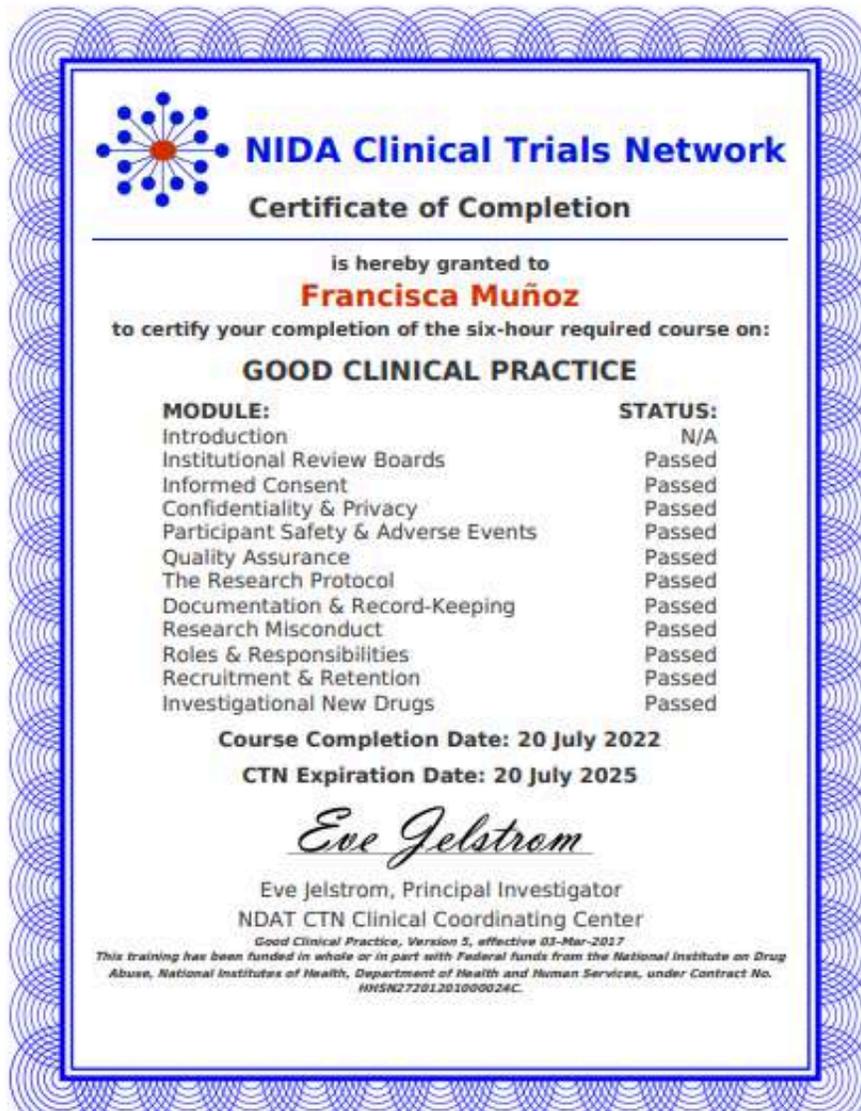
Zhou, B., Donnelly, M. E., Scholes, D. T., St. George, K., Hatta, M., Kawaoka, Y., & Wentworth, D. E. (2009). Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *Journal of Virology*, 83(19), 10309–10313. <https://doi.org/10.1128/jvi.01109-09>

Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

8. Anexos



Anexo 1: Certificado del curso de BCP realizado en The Global Health Network.



Anexo 2: Certificado del curso de BCP realizado en NIDA Clinical Trials Network.



RESEARCH ARTICLE

Inactivated Vaccine-Induced SARS-CoV-2 Variant-Specific Immunity in Children

🌐 Jorge A. Soto,^{a,b,c} 🌐 Felipe Melo-González,^{a,b,c} 🌐 Cristián Gutierrez-Vera,^{a,d} 🌐 Bárbara M. Schultz,^{a,b} 🌐 Roslye V. Berríos-Rojas,^{a,b} Daniela Rivera-Pérez,^{a,b} 🌐 Alejandro Piña-Iturbe,^{a,b} 🌐 Guillermo Hoppe-Elsholz,^{a,b} 🌐 Luisa F. Duarte,^{a,b} 🌐 Yaneisi Vázquez,^{a,b} Daniela Moreno-Tapia,^{a,b} 🌐 Mariana Ríos,^{a,b} 🌐 Pablo A. Palacios,^{a,d} 🌐 Richard Garcia-Betancourt,^{a,d} 🌐 Álvaro Santibañez,^{a,d} 🌐 Gaspar A. Pacheco,^{a,b} 🌐 Constanza Mendez,^{a,b} 🌐 Catalina A. Andrade,^{a,b} 🌐 Pedro H. Silva,^{a,b} 🌐 Benjamin Diethelm-Varela,^{a,b} Patricio Astudillo,^a 🌐 Mario Calvo,^f 🌐 Antonio Cárdenas,^g 🌐 Marcela González,^{h,i} 🌐 Macarena Goldsack,^a 🌐 Valentina Gutiérrez,^{a,i} Marcela Potin,^{a,k} 🌐 Andrea Schilling,^{l,dd} 🌐 Lorena I. Tapia,^{m,n} 🌐 Loreto Twele,^{o,pp} 🌐 Rodolfo Villena,^{q,ri} 🌐 Alba Grifoni,^r 🌐 Alessandro Sette,^{r,s} 🌐 Daniela Weiskopf,^t 🌐 Rodrigo A. Fasce,^t 🌐 Jorge Fernández,^t 🌐 Judith Mora,^t 🌐 Eugenio Ramírez,^t 🌐 Aracelly Gaete-Argel,^{u,v} Mónica L. Acevedo,^{u,v} 🌐 Fernando Valiente-Echeverría,^{a,w} 🌐 Ricardo Soto-Rifo,^{u,v} 🌐 Angello Retamal-Díaz,^{a,v} 🌐 Nathalia Muñoz-Jofré,^w **PedCoronaVac03CL Study Group**, 🌐 Xing Meng,^x 🌐 Qianqian Xin,^x 🌐 Eduardo Alarcón-Bustamante,^{y,z,aa} 🌐 José V. González-Aramundiz,^{bb} 🌐 Nicole Le Corre,^b 🌐 María Javiera Álvarez-Figueroa,^{bb} 🌐 Pablo A. González,^{a,b} 🌐 Katia Abarca,^{aa} 🌐 Cecilia Perret,^a 🌐 Leandro J. Carreño,^{a,d} 🌐 Susan M. Bueno,^{a,b} 🌐 Alexis M. Kalergis^{a,b,cc}

González Cortés, U de Chile), Rodolfo Villena, Paola Flores, Francisca Bartsch, Belén Sepúlveda, Daniela Garmendia, and Lorena González; at **Center CL12 (Hospital Clínico Universidad de Antofagasta, Universidad de Antofagasta)**, Antonio Cárdenas, Angello Retamal, Carmen Ludeña, Carolina Hermosilla, Gustavo Keilhold, Francisco Cammarata-Scalisi, Jessica Álvarez, Jessica Romero, Pia Villarroel, Francisca Muñoz, Jorge Maya, Andrés Canales, Margarita K. Lay, Christian Muñoz, and Roylester Araya.

Anexo 3: Artículo publicado del estudio clínico. La flecha indica el desglose de los participantes del centro CL12, correspondiente al centro de la región de Antofagasta (Soto et al., 2022).