Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Unidad de Posgrado

Caracterización del genoma completo del virus Influenza A (H1N1) pdm09 que circuló en el Perú durante 2015-2016

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Priscila Nayu LOPE PARI

ASESOR

Dra. Egma Marcelina MAYTA HUATUCO

Lima, Perú

2022

Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Lope, P. (2022). *Caracterización del genoma completo del virus Influenza A (H1N1) pdm09 que circuló en el Perú durante 2015-2016*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Priscila Nayu Lope Pari.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47046733
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7439-4351
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Egma Marcelina Mayta Huatuco
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06175080
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8471-1675
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Julio Solis Sarmiento
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09671619
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Jaime Roberto Sánchez Venegas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06120091
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Oscar Diego Evangelista Vargas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46626302
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Egma Marcelina Mayta Huatuco
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	06175080
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud pública
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Perú. Instituto Nacional de Salud (INS)
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto Nacional de Salud País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Chorrillos Avenida: Defensores del Morro Número: 2268 Latitud: -12.18256 Longitud: -77.016715
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2015 - 2016
URL de disciplinas OCDE	Bioinformática https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03 Virología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.02 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

Exped. Nº 214v-UPG-FCB-2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)

Siendo las 09:05 horas del día martes 02 de agosto de 2022, en Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace meet.google.com/uco-jreh-dhj, el Jurado de Tesis conformado por:

Dr.	Julio Solís Sarmiento	(Presidente)
Dr.	Jaime Roberto Sánchez Venegas	(Miembro)
Mg.	Oscar Diego Evangelista Vargas	(Miembro)
Dra.	Egma Marcelina Mayta Huatuco	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la señorita Bachiller Doña **PRISCILA NAYU LOPE PARI.**

Después de darse lectura al **Expediente Nº 214v-UPG-FCB-2021,** en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

"CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS INFLUENZA A (H1N1) pdm09 QUE CIRCULÓ EN EL PERU DURANTE 2015-2016", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: EXCELENTE con la nota de DIECINUEVE (19)

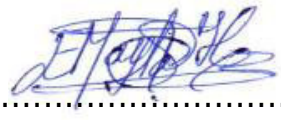
A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular, a la señorita Bachiller **PRISCILA NAYU LOPE PARI.**

Siendo las 11:10 am, se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día martes 02 de agosto del año 2022.

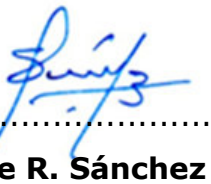
.....

Dr. Julio Solis Sarmiento
Profesor Principal a T.C.
PRESIDENTE
jsoliss@unmsm.edu.pe
RENACYT P0025960



.....

Dra. Egma M. Mayta Huatuco
Profesora Principal D.E.
ASESORA
emaytah@unmsm.edu.pe
RENACYT P00113460



.....

Dr. Jaime R. Sánchez Venegas
Profesor Asociado a D.E.
MIEMBRO
jaimesanchez@unmsm.edu.pe
RENACYT P0011489

.....

Mg. Oscar Evangelista Vargas
Profesor Auxiliar a T.C.
MIEMBRO
oevangelistav@unmsm.edu.pe
RENACYT P0051579

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. Facultad: CIENCIAS BIOLÓGICAS
2. UNIDAD DE POSGRADO
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad:
   Evaluadores de la originalidad de los documentos de investigación conducentes a los grados académicos de la UPG (RD N° 564-D-FCB-2018):
   _ Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
   _ Dra. Mónica Arakaki Makishi
4. Apellidos y Nombres de la autoridad académica: Dr.César Augusto Aguilar Puntriano, Director de la Unidad de Posgrado
5. Operador del Programa Informático de Similitudes:
   X Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
   _ Dra. Mónica Arakaki Makishi
6. Documento evaluado: **"Caracterización del genoma completo del virus Influenza A(H1N1) pdm09 que circuló en el Perú durante 2015-2016"**
7. Tesis para Grado Académico de: Magíster en Biología Molecular
8. Autor del documento:
   Apellidos: LOPE PARI
   Nombres: PRISCILA NAYU
9. Fecha de recepción de documento: 18 de setiembre de 2021
10. Fecha de aplicación del programa informático de similitud:
    18 de setiembre de 2021
11. SOFWARE UTILIZADO
    - Turnitin
12. Configuración del programa detector de similitudes
    X Excluye texto entrecomillado
    X Excluye bibliografía
    X Excluye cadenas menores a 40 palabras
    - Otros criterios (especificar)
13. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes
    - Porcentaje en letras y números: NUEVE por ciento de similitud (09%)
14. Fuentes originales de las similitudes encontradas
    - Indicarlas en decreciente y su respectivo porcentaje: Se adjunta Informe respectivo
15. Observaciones
    ……..
16. Calificación de originalidad
    - Documento cumple criterios de originalidad, sin observaciones.
17. Fecha del informe
    1° Informe: 20 de setiembre de 2021

UNMSM Firmado digitalmente por SILVA DAVILA Diana Fernanda FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.09.2021 13:30:11 -05:00

DRA. DIANA FERNANDA SILVA DÁVILA
Miembro Evaluador

UNMSM Firmado digitalmente por AGUILAR PUNTRIANO César Augusto FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.09.2021 23:30:01 -05:00

DR. CÉSAR A. AGUILAR PUNTRIANO
Director de la Unidad de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS), por brindarnos las instalaciones del Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular (LBBM) y el Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorio (LRNVR) totalmente equipado para cumplir los objetivos de la presente tesis.

A la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por permitirme continuar con mi formación académica.

A mis padres Adela Pari Quispe y Oswaldo Lope Apaza por brindarme su apoyo, por cuidarme y preocuparse por mí, por enseñarme a luchar y no rendirme, por toda la paciencia y comprensión, por guiarme y estar a mi lado en cada paso.

A mis tíos Lucila Pari Quispe, Bertha Pari Quispe y Rafael Yucra por brindarme su apoyo, por preocuparse y estar pendientes de mi persona, por todos sus consejos.

A mi asesora Dra. Egma Mayta por parte de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por sus palabras de aliento, su dedicación, su paciencia y sus valiosas recomendaciones en la elaboración de la tesis.

A mi co-asesor MSc. Henri Bailon Calderon por sus acertadas recomendaciones, su apoyo y compromiso para el desarrollo de la tesis en el Instituto Nacional de Salud.

Al Blgo. Carlos Patricio Padilla Rojas por sus invaluables consejos y apoyo incondicional en la ejecución y elaboración de la tesis, por brindarme su amistad, por contribuir y guiarme en mi crecimiento profesional, gracias Carlos, por siempre estar disponible y presto a brindar tu apoyo, gracias por todo.

A la Tec. Méd. Maribel Huaringa responsable del Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorio durante el tiempo del desarrollo de la presente tesis, por darme un lugar en su equipo de laboratorio y brindarme las facilidades para realizar la tesis.

A la Blga. Nancy Rojas por brindarme su amistad y guiarme en el desarrollo de la tesis.
A los Téc. Lab. Sila Ruiton Cueva y Emelda Gallardo por su amistad, por sus invaluables consejos y apoyo en el laboratorio.

Dedico este trabajo a mis amados padres Adela Pari y Oswaldo Lope por su apoyo incondicional por sus consejos y fuerza, por brindarme su amor infinito, dedicación y comprensión, motivo principal para seguir adelante…

CONTENIDO

	Pág.
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÖN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Genoma viral y proteínas codificantes	6
2.2 Ciclo de replicación	6
2.3 Variación genética	7
2.4 Resistencia a los Antivirales	9
2.5 Impacto sanitario de la gripe	10
2.6 Metodologías para el análisis molecular de genomas virales	11
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Materiales	17
4.2. Metodología	18
4.2.1. Determinación de genotipos por High Resolution Melting	18
4.2.2. Secuenciación del genoma completo de Influenza A(H1N1) pdm09	20
V. RESULTADOS	33
5.1. Determinación de genotipos de Influenza A(H1N1)pdm09 Mediante High Resolution Melting	33
5.2. Secuenciación del genoma completo del virus Influenza A(H1N1)pdm09	45
5.2.1. Amplificación por M-RTPCR del genoma completo del virus Influenza A(H1N1)pdm09 en 10 genotipos	45

5.2.2. Análisis bioinformático del genoma completo de los genotipos mas frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 47
5.2.3. Análisis filognético del genoma completo del virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislados peruanos 60
5.2.4. Identificación de variantes antigénicas en aminoácidos de los 8 segmentos del genoma viral de influenza A(H1N1)pdm09 70
5.2.5. Análisis estructural in silico la proteína Hemaglutinina y Neuraminidasa de los aislamientos de influenza circulantes en el 2015-2016 80
VI. DISCUSIÓN 97
6.1. High Resolution Melting 97
6.2. Secuenciamiento del genoma complete 99
6.3. Filogenia 101
6.4. Variaciones aminoacídicas 104
6.5. Concordancia entre HRM y ~~s~~ecuenciación 114
6.6. Análisis estructural *in sílico* 116
VII. CONCLUSIONES 120
VIII. RECOMENDACIONES 121
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 122
X. ANEXOS 143
XI. PRODUCCION CIENTÍFICA 196

ABREVIATURAS

A°	Amstrong
ADN	Ácido Deoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucléico
ARNv	Ácido ribonucléico viral
CAP	cápside
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CT	Thershold Cycle
dNTP	Desoxiribonucleósido trifosfato
dsDNA	Ácido Deoxiribonucleico de doble cadena
DTT	Dithiothreitol
EEUU	Estados Unidos
ETI	Enfermedad tipo Influenza
FDA	Food and Drug Administration
GTR	Modelo General de tiempo reversible
GTR+I	Modelo GTR considerando sitios invariantes
GTR+G	Modelo GTR considerando una distribución gamma
HA	Proteína Hemaglutinina
HBV	Virus Hepatitis B
HKY	Modelo de sustitución de Hasegawa, Kishino y Yano
HNF	Hisopado Nasal y Faringeo
HRM	High Resolution Melting
HS	High sensibility
INA	Inhibidor de neuraminidasa
INF	Interferón
INS	Instituto Nacional de Salud
IRAG	Infección Respiratoria Aguda Grave
K80	Modelo de sustitución Kimura 1980
LRNVR	Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorio
M	Proteína de la Matriz

MCMC	Markov chain Monte Carlo
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NA	Proteína Neuraminidasa
NGS	Next Generation Sensibility
nm	nanometros
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
^{o}C	Grados Celsius
NP	Proteína Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Reading Frame
PA	Proteína Polimerasa Ácida
pb	Pares de bases
PB1	Proteína Polimerasa Basica 1
PB2	Proteína Polimerasa Básica 2
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
RMSD	Desviación de la raíz media cuadrada
RpdR	ARN polimerasa dependiente de ARN
RSB	Ribosome binding site
RT	Retrotranscripción
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TLR	receptor tipo Toll
µL	Microlitro
µM	Micromolar
UV	Ultravioleta
kb	Kilobases

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Metadata del virus Influenza A/California/07/2009(H1N1)	24
Tabla 2.	Programas usados para el análisis bioinformático	25
Tabla 3.	Casos positivos Influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015 - 2016 según departamentos.	34
Tabla 4.	Genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 del Perú, mediante HRM para el gen de hemaglutinina.	37
Tabla 5.	Genotipos frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 del Perú mediante HRM para el gen de la matriz.	38
Tabla 6.	Estadística de los reads obtenidos	49
Tabla 7.	Resultados del ensamblado de los aisaldos peruanos	51
Tabla 8.	Metabase de cepas referenciales 2015 – 2016	62
Tabla 9.	Análisis de Jmodel Test para los segmentos del genoma de virus influenza A(H1N1)pdm09	63
Tabla 10.	Sustitución de aminoácidos del segmento PB2 en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.	71
Tabla 11.	Sustitución de aminoácidos del segmento PB1 en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016	72
Tabla 12.	Sustitución de aminoácidos del segmento PA en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.	73
Tabla 13.	Sustitución de aminoácidos del segmento HA en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.	74
Tabla 14.	Sustitución de aminoácidos del segmento NP en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016	75

Tabla 15.	Sustitución de aminoácidos del segmento NA en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.	76
Tabla 16.	Sustitución de aminoácidos del segmento M en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.	77
Tabla 17.	Sustitución de aminoácidos del segmento NS en virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.	78
Tabla 18.	Índice de Ramanchandram y RDMS de los modelos de la proteína Hemaglutinina	88
Tabla 19.	Índice de Ramanchandram y RDMS de los modelos de la proteína Neuraminidasa	96
Tabla 20.	Genotipos más frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 del Perú durante el año 2015, mediante la técnica de HRM para el gen de hemaglutinina y de la Matriz	143
Tabla 21.	Genotipos más frecuentes del virus influenza A(H1N1) pdm09 del Perú durante el año 2016, mediante la técnica de HRM para el gen de hemaglutinina y de la matriz	146
Tabla 22.	Genotipos más frecuentes del virus influenza a (H1N11) pdm09 del Perú durante los años 2015-2016, mediante la técnica de HRM para el gen de hemaglutinina y de la Matriz según departamentos del Perú.	166
Tabla 23.	Frecuencia de genotipos frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 según grupo etario durante los años 2015-2016 por HRM.	167
Tabla 24.	Frecuencia de genotipos frecuentes del virus influenza A (H1N1) pdm09 según sexo durante los años 2015-2016 por HRM	167

Tabla 25.	Frecuencia de genotipos frecuentes del virus influenza A (H1N1) pdm09 según clasificación cínica durante los años 2015-2016, por HRM.	167
Tabla 26.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Ancash/INS4_421/2016	168
Tabla 27.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Arequipa/INS5_081/2016	169
Tabla 28.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Arequipa/INS5_881/2016	170
Tabla 29.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Arequipa/INS6_868/2016	171
Tabla 30.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Cusco/INS5_825/2015	172
Tabla 31.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/La_Libertad/INS5_380/2015	173
Tabla 32.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Lambayeque/INS5_514/2015	174
Tabla 33.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Lambayeque/INS5_790/2015	175
Tabla 34.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Lima/INS3_701/2016	176
Tabla 35.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Lima/INS4_403/2016	177
Tabla 36.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Lima/LIMAM16_372/2016	178
Tabla 37.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Loreto/INS5_168/2016	179
Tabla 38.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Pasco/INS6_335/2016	180
Tabla 39.	Datos del ensamblado del aislado peruano A/Piura/INS4_288/2016	181

Tabla 40. Datos del ensamblado del aislado peruano A/Piura/INS4_294/2016 182
Tabla 41. Datos del ensamblado del aislado peruano A/Piura/INS4_888/2016 183
Tabla 42. Datos del ensamblado del aislado peruano A/Puno/INS6_006/2016 184
Tabla 43. Datos del ensamblado del aislado peruano A/Arequipa/INS6_950/2016 185
Tabla 44. Datos del ensamblado del aislado peruano A/Arequipa/INS8_499/2016 186
Tabla 45. Datos del ensamblado del aislado peruano A /Tumbes/INS4_860/2016 187

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Distribución de Casos Positivos Influenza A(H1N1)pdm09 2015-2016 según criterios de elegibilidad 35

Figura 2. Curva de amplificación del gen Hemaglutinina 36

Figura 3. Curva de amplificación del gen de la Matriz 36

Figura 4. Curva de High Resolution Melting normalizada de los genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 para el gen de hemaglutinina. 37

Figura 5. Curva de High Resolution Melting normalizada de los genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 para el gen de la matriz. 38

Figura 6. Frecuencia relativa de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015-2016, por HRM para el gen de hemaglutinina. 39

Figura 7. Frecuencia relativa de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015-2016, por HRM para el gen de la Matriz. 39

Figura 8. Frecuencia relativa de genotipos más frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015-2016, por HRM combinando los genes M y HA. 40

Figura 9. Distribución de genotipos frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 según departamento durante los años 2015-2016. 41

Figura 10. Frecuencia acumulada de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 según grupo etario durante los años 2015-2016. 42

Figura 11. Frecuencia acumulada de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 según sexo durante los años 2015-2016. 43

Figura 12.	Frecuencia acumulada de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 según clasificación clínica durante los años 2015-2016.	44
Figura 13.	Amplificación por M-RTPCR del genoma completo del virus influenza A(H1N1)pdm09.	46
Figura 14.	Calidad de secuencia por base del R1_001.fastq sin procesar del aislado A/Puno/INS6_006/2016	47
Figura 15.	Calidad de secuencia por base del R2_001.fastq sin procesar del aislado A/Puno/INS6_006/2016	48
Figura 16.	Calidad de secuencia por base del R1_001.fastq procesado con Sickle del aislado A/Puno/INS6_006/2016	48
Figura 17.	Calidad de secuencia por base del R2_001.fastq procesado del aislado A/Puno/INS6_006/2016	48
Figura 18.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026431 segmento 7	56
Figura 19.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026432 segmento 8	56
Figura 20.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026433 segmento 4	57
Figura 21.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026434 segmento 6	57
Figura 22.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026435 segmento 2	58
Figura 23.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026436 segmento 5	58
Figura 24.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026437 segmento 3	59
Figura 25.	Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026438 segmento 1	59
Figura 26.	Alineamiento de los genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 y genormas de referencia del segmento HA usando el programa MEGA7	61

Figura 27.	Distribución de la probabilidad a lo largo de las generaciones usando Tracer.	64
Figura 28.	Árbol filogenético del genoma completo del Virus Influenza A(H1N1)pdm09	67
Figura 29.	Árbol filogenético del gen Hemaglutinina del Virus Influenza A(H1N1)pdm09	68
Figura 30.	Análisis Skyline Bayesian del Virus Influenza A	69
Figura 31.	Gráfico de Ramachamdram del modelamiento de la proteína Hemaglutinina del aislado A/Arequipa/INS5_081/2016	81
Figura 32.	Comparación de modelos de la proteína HA	82
Figura 33.	Detalle de la estructura tridimensional e las mutaciones de la proteína HA de los aislados peruanos.	87
Figura 34.	Gráfico de Ramachamdram del modelamiento de la proteína Neuraminidasa del aislado A/Lambayeque/INS5_790/2015	89
Figura 35.	Comparación de modelos de la proteína NA	90
Figura 36.	Detalle de la estructura tridimensional e las mutaciones de la proteína NA de los aislados peruanos.	94

RESUMEN

La gripe es un problema grave de salud pública, es asociada a muertes y enfermedades graves en poblaciones de alto riesgo. Entre los años 2015-2016, se detectaron 788 casos de infecciónes con virus de influenza A(H1N1)pdm09 en el Perú según el Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorios del INS. Las epidemias pueden tener impacto en los servicios de salud y generar repercusiones económicas debido a la reducción de la productividad laboral. Aunque existe la vacuna, la posibilidad que se generen nuevas mutaciones del virus hace necesario la constante vigilancia epidemiológica; por lo que existe la necesidad de evaluar técnicas moleculares que permitan caracterizar genotipos de influenza A(H1N1)pdm09, y de esa forma vigilar genotipos que podrían ser más virulentos o resistentes a antivirales. El presente estudio caracterizó aislamientos virales del virus influenza A(H1N1)pdm09 circulantes en el Perú durante los años 2015 a 2016 usando la técnica High Resolution Melting (HRM) para la identificación de genotipos en base al gen de la Hemaglutinina y al gen de la Matriz. Se detectaron 10 perfiles de HRM de Influenza A(H1N1)pdm09 entre los aislamientos analizados. La secuenciación del genoma completo de dos representantes de cada perfil de HRM reveló mediante el análisis filogenético que los aislados peruanos se encuentran agrupadas en el clado 6B, pudiendo observar diferentes nodos dentro del clado que indicaría la presencia de una variedad de genotipos. Se identificó variación nucleotídica y cambios de aminoácidos en todos los segmentos del genoma en comparación con la cepa A/California/07/2009. El gen de la hemaglutinina muestra las variaciones D114N, K180Q, K202T y S220T dentro de los sitios antigénicos del dominio HA1. El gen de la neuraminidasa presenta las variaciones V241I, N369K, N386K y K432E que han sido asociadas anteriormente con una menor interacción de NA con oseltamivir. Nuestros resultados filogenéticos concuerdan con estudios previos en sudamérica. Sin embargo, se requiere evaluar la significancia de las mutaciones observadas en HA y NA mediante métodos biológicos y bionformáticos.

Palabras clave: Influenza A(H1N1)pdm09, HRM, NGS, filogenia, variación aminoacídica

ABSTRACT

Flu is a serious issue of public health, it is associated with deaths and serious illnesses in high-risk populations. Between the years 2015-2016, 788 cases of infections with influenza A (H1N1) pdm09 viruses were detected in Peru, according to the National Respiratory Virus Reference Laboratory of the Peruvian NIH. Epidemics can have an impact on health services and generate economic repercussions due to the reduction of labor productivity. Although the vaccine exists, the occurrence of new mutations of the virus makes it necessary to have constant epidemiological surveillance. Therefore, there is a need to evaluate molecular techniques that allow the characterization of influenza A H1N1 pdm09 genotypes and, in this way, monitor genotypes that could be more virulent or resistant to antivirals. The present study characterized viral isolates of the circulating influenza A (H1N1) pdm09 virus in Peru during the years 2015 to 2016 using the High Resolution Melting (HRM) technique for the identification of genotypes based on the Hemagglutinin gene and the gene of the Matrix. 10 HRM profiles of A(H1N1) pdm09 were detected among the isolates analyzed. The complete genome sequencing of two representative isolates of each profile was done, and the phylogenetic analysis indicated that the Peruvian strains are grouped in clade 6B, it is possible to observe different nodes within this clade that would indicate the presence of a variety of genotypes. Nucleotide variation and amino acid changes were identified in all segments of the genome compared to the vaccine strain A/California/7/2009. The hemagglutinin (HA) gene shows the mutations D114N, K180Q, K202T, and S220T, within the antigenic sites of the HA1 domain. The neuraminidase (NA) gene shows the mutations V241I, N369K, N386K, and K432E. These mutations have been associated previously with less interaction of NA with oseltamivir. Our phylogenetic results are consistent with other results in sudamerica. Therefore, the significance of mutations must be evaluated using biologic and bioinformatics assays.

Key words: influenza A (H1N1)pdm09, HRM, NGS, phylogeny, amino acid variation

I. INTRODUCCIÓN

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa, causada por los virus de influenza (Fields *et al.*, 2007). Los virus Influenza A pertenece a la familia Orthomyxoviridae. El virus de la gripe es un patógeno respiratorio importante que causa epidemias anuales y pandemias ocasionales, es un virus ARN de sentido negativo de cadena sencilla, con una envoltura derivada de la célula huésped (Viboud *et al.,* 2006). Esta envoltura alberga la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y la proteína M2. La HA tiene un diámetro de 4 a 6 nm proyectándose por encima de la envoltura en una proporción mayor a la NA (Talledo *et al.*, 2009), el genoma también codifica dos polimerasas básicas (PB1 y PB2), una polimerasa ácida (PA), una proteína de la nucleocápside (NP), dos proteínas de matriz (M1 y M2) codificadas por el mismo segmento de ARN con diferente marco de lectura, y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) codificadas de manera similar a las proteínas de matriz (Rovid, 2016).

La circulación de la gripe causada por el virus Influenza A(H1N1)pdm09, desde el 2015 hasta 2021 ha tenido una serie de fluctuaciones, los años con mayor prevalencia fueron el 2016 y 2018, siendo los años 2015, 2017 y 2019 de prevalencia baja (WHO, 2021). Durante el 2020 se ha reportado casos de gripe por influenza hasta la semana epidemiológica (SE) 17. En lo que va del 2021, la enfermedad respiratoria de mayor prevalencia es COVID-19, mientras que solo se ha reportado dos casos de influenza A(H3N2).

La circulación de los agentes respiratorios virales es afectada por diferentes factores, siendo uno de estos factores las caracteristicas genéticas del virus. La literatura recoge un reducido número de estudios que caractericen a los virus respiratorios en el Perú, en comparación con otros países de América del Sur (Oliveira *et al.,* 2014; Arango *et al.,* 2015). En particular, hay pocos estudios que describen el genoma total de cepas circulantes del virus de Influenza A(H1N1)pdm09, su relación filogenética y los cambios en sus regiones antigénicas y de resistencia a antivirales.

Lo anterior limita la disponibilidad de información sobre resistencia a los antivirales, como el oseltamivir, para la toma oportuna de decisiones en cuanto a vacunación y tratamiento dentro del territorio.

La caracterización del virus de influenza A(H1N1)pdm09 es necesaria para la identificación de nuevas variantes genéticas, en particular la secuenciación del genoma completo del virus de influenza nos proporciona información más completa del virus (Fang *et al.*, 2015; Liu *et al.,* 2015), sobre todo como está cambiando o mutando y como estas mutaciones afectan la antigenicidad y la resistencia a los antivirales (Garcia *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2013). Desde el 2009 esta cepa ha presentado resistencia a los adamantanos y en algunos casos a inhibidores de la neuraminidasa (Soto, 2012).

Actualmente, existen varios ensayos que permiten el análisis de las mutaciones en los nucleótidos específicos basados en la secuenciación de Sanger que se considera como el "gold standard" (Tsiatis *et al.,* 2010).

El presente estudio permitió caracterizar el virus influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015 y 2016 circulantes en el Perú usando el método de HRM como screening y el secuenciamiento NGS, permitiendo obtener información más amplia y actualizada del genoma completo, analizando la relación filogenética de estos aislados, su variabilidad antigénica y posibles mutaciones relacionadas a la resistencia a antivirales, por lo que contribuirá a la toma de decisiones para la adquisición de vacunas en el país y orientará el tratamiento que se adoptaría en nuestra población. Este estudio esta enmarcado como una prioridad nacional debido a la importancia de estas infecciones para la salud pública.

II. ANTECEDENTES

La gripe o influenza es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa y reemergente causada por el virus de Influenza, de la familia Orthomyxoviridae. Causante de infecciones en las vías respiratorias, puede confundirse con el resfriado común en sus inicios. Sin embargo, la gripe causa sintomatología general con signos de fiebre (Merck y Dohme, 2005) en algunos casos puede existir complicaciones con neumonía resultado en casos fatales en niños y adultos mayores. La transmisión del virus es de forma directa mediante estornudos; debido a su modo de transmisión la influenza generó a lo largo de la historia una serie de epidemias y pandemias en la población humana causando una serie de defunciones, sobre todo en países en vías de desarrollo.

En la actualidad existen muchas investigaciones realizadas desde la pandemia del 2009 causada por el virus Influenza A(H1N1)pdm09 a nivel mundial, con mayor énfasis en los genes que codifican para las proteínas de envoltura como neuraminidasa, hemaglutinina y la proteína de la matriz, debido a su uso como blancos para el diseño de fármacos antivirales, vacunas, y por su potencial mutagénico característico de este virus.

Le y Leluk (2011) compararon 92 proteínas similares al canal de protones 2RLF M2 del aislamiento A/Udorn/307/1972(H3N2), evidenciándose que la proteína M2 es conservada. El análisis filogenético indica que nueve proteínas M2 de H3N2 están estrechamente relacionados con 2RLF M2. Además, se ha determinado por simulación de dinámica molecular que las mutaciones que inducen resistencia a los inhibidores M2 son L26I y A30T tal como lo describió Laohpongspaisan *et al.* (2009). Las posiciones 27-31 (V27 y S31 en 2RLF) juegan un papel importante en la función del canal de protones, las mutaciones en estas posiciones aumentan la resistencia a la amantadina/rimantadina (Intharathep *et al.,* 2008; Cady *et al.,* 2010).

Barrero *et al.* (2011), en su estudio de secuenciación del genoma completo del virus pandémico en Argentina, encuentran por inferencia bayesiana que las secuencias del genoma completo argentinos están agrupadas en el clado 7. Encontraron cambios no conservativos en PB2 (S199A), HA (S220T), NP (V100I), NS1 (I123V) y NA (V106I y N248D), se identificaron tres variantes de NA entre los virus H1N1pdm: grupo A/California/04/2009 con variantes V106 y N248, el A/Osaka/164/2009 con I106 y N248, y la A/Nueva York/18/2009 con I106 y D248; incluyendo además cepas resistentes al oseltamivir (H275Y). Al igual que Ghedin (2011), en su estudio filogenético de una cepa de Influenza A/H1N1pdm09 de un paciente inmunosuprimido también encuentran la resistencia a oseltamivir por la variante de la NA en H275Y mediante el método de Sanger. Laguna-Torres *et al.* (2011) en el análisis genético de la gripe también mostraron que la mutación H274Y confiere resistencia a oseltamivir detectando por primera vez en cepas de Honduras influenza A/H1N1 a principios del 2008. Entre noviembre 2013 y febrero 2014, Japón experimentó infecciones con virus de influenza A(H1N1)pdm09 con resistencia cruzada para oseltamivir y peramivir, relacionadas a la sustitución de H275Y en NA (Takashita *et al.,* 2015).

Li *et al.* (2013), en su análisis filogenético en cepas del virus Influenza A(H1N1)pdm09 del noreste de China de casos relacionados a infección grave y muerte, analizando el genoma completo encontró que los genes HA, NA, M, NP y NS del virus H1N1pdm09 provienen de la influenza porcina tipo A/H1N1, mientras que los genes PB2 y PA provienen a partir de virus de la gripe aviar, y el gen PB1 originó a partir de virus de la gripe humana estacional y en comparación con la cepa de la vacuna A/California/07/2009 (H1N1), el gen de mayor tasa de mutación fue HA (0,7-2,6%), seguido de NA (0,6-1,7%) y último fue M (tasa de mutación 0-0,6%), tres sustituciones de aminoácidos de HA se produjeron en los sitios de unión al receptor de HA y determinante antigénico, incluyendo S179N y K180T (situado en el sitio antigénico Sa), y D239N (situado en el sitio antigénico Ca).

Múltiples trabajos de investigación realizados brindan un enfoque más actual acerca de las cepas circulantes del virus Influenza A(H1N1)pdm09 y sus variaciones a nivel mundial, podemos observar así, mediante estos resultados que el virus de la pandemia sigue siendo en gran medida susceptibles al oseltamivir y zanamivir, reportándose casos esporádicos de resistencia al oseltamivir en todo el mundo (CDC, 2009; Le *et al.,* 2010).

Sin embargo, son pocos los estudios que se han centrado en muestras colectadas en el Perú. La literatura recoge un reducido número de estudios filogenéticos sobre virus respiratorios en el Perú, en comparación con otros países de América del Sur (Oliveira *et al*., 2014; Arango *et al.,* 2015).

En el trabajo de García *et al.* (2013), basado en la secuenciación del gen de la NA del virus de Influenza A(H1N1)pdm09 de cepas circulantes en el Perú se encontró la mutación H275Y, relacionado al primer caso de resistencia en el Perú. Otro estudio realizado por Padilla *et al.* (2014), donde secuencian todo el genoma de una cepa aislada de un paciente con infección leve, sus resultados mostraron cambios de nucleótidos y de aminoácidos en todos los segmentos del genoma; en el gen de la hemaglutinina (HA) se identificaron las mutaciones K180Q, E391K, D114N, S202T, S220T, A273T, K300E, I338V, S468N, y E516K; en el gen de la neuraminidasa (NA) se encontraron: L40V, N44S, N200S y N248D; en el gen de la proteína de la matriz (M1): V80I, M192V y K230R; en el gen de la polimerasa básica 2 (PB2): R54K, M66I, D195M, R293K, V344M, I354L, y V731I; en el gen de la polimerasa básica 1 (PB1): S98T, G154D, Y397M y I435T; en el gen de la polimerasa ácida (PA): P224S, N321K y A343T; en el gen de la proteína no estructural (NS): L90I, I123V, y N205S; y en el gen de la nucleoproteína (NP): V100I y S498N. A pesar de haber encontrado varias mutaciones para la cepa analizada no se encontraron mutaciones asociadas a resistencia para los fármacos antivirales. Sin embargo, se encontraron las mutaciones V241I y N369K en NA, que fueron asociados previamente con la estabilidad del virus resistente (Dakhave *et al.,* 2013).

En la actualidad el uso de los inhibidores de neuraminidasa (NA) oseltamivir y zanamivir son recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el tratamiento de pacientes con influenza y como profiláctico (WHO, 2010). Sin embargo, no se debe descartar el desarrollo de las resistencias y las variaciones en la antigenicidad del virus influenza A(H1N1)pdm09, hecho que es de suma importancia para la vigilancia y el desarrollo de nuevas vacunas. Actualmente, se producen vacunas cuya aplicación anual es recomendada por la OMS sobre todo en personas vulnerables. Sin embargo, el esfuerzo que se hace para la generación de la vacuna anualmente se ve amenazada por las frecuentes mutaciones del virus que pueden producir cambios antigénicos en su superficie ocasionando la reformulación de la vacuna.

a. Genoma viral y proteínas codificantes

El virus influenza está compuesto por un genoma ARN lineal con sentido negativo y contiene de 10 a 11 marcos de lectura abierta (ORF, siglas de Open Reading Frame), su genoma completo consta de 13600 nucleótidos (Talledo *et al.*, 2009), contiene tres segmentos de genes grandes codifican para el complejo de polimerasa PB2, PB1 y PA (Steinhauer *et al.*, 2002), dos genes codifican para las proteínas de envoltura viral HA y NA que cumplen un papel fundamental en las interacciones entre el virus, la célula hospedera y el sistema inmune del individuo (Talledo *et al.*, 2009). M1 y M2 son codificadas por dos genes del mismo segmento y NS1 y NS2 son codificadas por otros genes (Rabadan *et al.*, 2007). Los genes hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de los virus influenza A suelen mutar a altas frecuencias (Wright *et al.*, 2013), generando alteraciones en las características antigénicas de las glicoproteínas de superficie y la susceptibilidad a los fármacos antivirales.

b. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación inicia cuando el virus se adsorbe a los residuos del ácido siálico unidos a galactosa por enlaces α-2,6 presentes en la superficie de la célula epitelial del tracto respiratorio. El virus es interiorizado por una endocitosis mediada

por receptor, la acidificación del endosoma provoca un cambio conformacional de la HA favoreciendo la unión a la membrana celular y viral, además de favorecer la liberación del genoma viral al citoplasma por la entrada de protones al interior del virus mediante la función como canal iónico de la proteína M2. Los segmentos virales ingresan al núcleo por la NP (Arias *et al.*, 2009).

Una vez en el núcleo comienza la transcripción y la replicación. El transcrito utiliza la maquinaria celular para la incorporación del CAP al 5´, la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN (RpdR) sintetiza el ARN complementario. El ARNv sintetizado *de novo* es transportado al citoplasma, donde conduce a la síntesis de las proteínas virales. Las nucleoproteínas (NP) sintetizadas se translocan al núcleo y se ensamblan con los nuevos genomas virales. La HA y NA sintetizadas en el retículo endoplasmático son transportadas hacia la membrana celular.

Una secuencia señal conservada participa en la interacción con la proteína M1, formando una bóveda interna de la particula viral (Palese, 2004). Debido a esto es posible que diferentes segmentos génicos de diferentes virus que coinfectan a una célula huésped puedan ser empaquetados dando origen a nuevas variantes virales. Una vez en la superficie celular, la proteína NA corta los residuos de ácido siálico en la superficie celular infectada promoviendo la liberación de las partículas virales (Arias *et al.*, 2009).

c. Variación genética

Los virus de la influenza A suelen mutar rápidamente e intercambiar segmentos de ARN entre diferentes subtipos o entre el mismo subtipo, generando nuevas variantes de virus y contribuyendo al aumento de la diversidad. Las nuevas variantes virales son potenciales causas de pandemias (Garten *et al.,* 2009). Los virus de influenza presentan una alta tasa de error (1×10^{-3} a 1×10^{-5}) durante la replicación por la baja fidelidad de RpdR produciéndose las mutaciones en su secuencia de nucleótidos (Salazar *et al.*, 2010); esto genera progenie que se denomina cuasi-

especies que pueden llegar a ser defectuosas o adaptarse a los cambios ambientales y a nuevos hospederos (Biebriche, 1999).

La diversidad genética de los virus influenza se debe a las mutaciones por la baja fidelidad del ARN polimerasa y al reordenamiento de los segmentos virales. Lo que conlleva a los brotes de influenza con gran significado en la población humana ya que causaron mortalidad significativa como la gripe de 1918 conocida como la influenza española A/H1N1, la gripe asiática A/H2N2 en 1957, la influenza de Hong Kong A/H3N2 en 1968 y la gripe porcina A/H1N1 en 2009 como consecuencia del reordenamiento genómico con virus de origen zoonótico (Kilbourne, 2006). Estas nuevas variantes tienen al cerdo como "vasos mezcladores" ya que pueden albergar diferentes virus de origen aviar y humano por tener receptores para ambos huéspes, siendo un alberge para el origen de nuevas variantes con potencial pandémico (Brown *et al.,* 1998).

Deriva antigénica (variaciones menores): La deriva antigénica se da mediante cambios de nucleótidos individuales o mutaciones puntuales en los genes que codifican a los sitios antigénicos de la HA y la NA, sobre todo a mutaciones en HA (Wilson y Cox, 1990). Las mutaciones en los residuos de las bolsas de unión al receptor según su estructura tridimensional pueden alterar la antigenicidad de un virus o modificar la afinidad por el receptor (McDonald *et al.,* 2007). La selección de las sustituciones de aminoácidos es dirigida, por la presión inmunológica, ya que la HA es el principal blanco de la respuesta inmune del hospedero. Los aminoácidos que conforman la HA son altamente mutables excepto el sitio de unión al receptor que es muy conservado (Talledo *et al*., 2009). La velocidad de deriva antigénica es diferente en las distintas proteínas estructurales del virus siendo más trascendente desde el punto epidemiológico la variación en HA. Ya que pueden ocasionar brotes epidémicos estacionales debido a la alteración de la proteína en su estructura secundaria o terciaria que modifican sus propiedades antigénicas.

Salto antigénico (variaciones mayores): Las variaciones mayores implican al reordenamiento como causa principal de la aparición de nuevos subtipos. Este mecanismo puede darse en los ocho segmentos virales cuando una célula sufre una coinfección; por lo tanto, existen 256 posibles combinaciones teóricas (Sholtissek, 1978); pero con mayor prevalencia afecta al cambio total de la matricula antigénica del virus los cambios ocurridos en la HA y NA o a ambas.

d. Resistencia a los Antivirales

Inhibidores de Neuraminidasa: El oseltamivir (Tamiflu) o el zanamivir (Relenza) son los agentes antivirales recomendados para la prevención y el tratamiento de la influenza (CDC, 2009; Bautista *et al.,* 2010), así mismo las cepas de virus Influenza A y B son susceptibles a estos antivirales (CDC, 2009); sin embargo, se han identificado casos esporádicos de resistencia a oseltamivir en virus de Influenza H1N1pdm09 (Baz *et al.,* 2009; Le *et al.,* 2010). El mecanismo para el desarrollo de la resistencia a oseltamivir se da por la reducción de la eficacia de unión de la HA a su receptor y la sustitución de aminoácidos en el sitio activo de la NA, siendo la sustitución más común la posición 275 (H275Y) (Le *et al.,* 2010). El mecanismo de acción de zanamivir se basa en la inhibición de la actividad de neuraminidasa, esta droga es un análogo al acido siálico (Mendel *et al.,* 1998).

Durante la temporada 2013-2014, el 98,2% de los virus H1N1 2009 analizados para la vigilancia eran susceptibles al oseltamivir mientras que el 100% eran susceptibles al zanamivir. Por tal motivo se han reportado varios casos aislados de resistencia al oseltamivir entre personas inmunodeprimidas o con tratamiento quimio profiláctico con infección por el virus Influenza A(H1N1)pdm09 (CDC, 2009); en tanto, es importante para la salud pública la vigilancia de la resistencia a antivirales como oseltamivir entre los virus de influenza.

Adamantanos (Amantadina y Rimantadina): La amantadina fue aprobada por la FDA en 1976 y su uso se extendió por su amplia disponibilidad y bajos costos. Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la actividad del canal iónico de la proteína M2, evitando la liberación del ARN viral al citoplasma. Este compuesto actúa

solo contra el virus de Influenza A. La sustitución en al menos uno de los residuos del dominio de transmembrana de la proteína M2, L26F, V27A, A30T, S31N, y G34E, confiere resistencia a los adamantanos (Boivin *et al.,* 2002).

Durante los años 2003 y 2004 la resistencia a la adamantina en los virus de Influenza A aumento a nivel mundial. Según la OMS y CDC las cepas resistentes aumentaron de un 0,4% entre 1994 y 1995 a un 12,3% entre 2003 y 2004 (Bright *et al.,* 2006). Durante 2005 y 2006, el CDC determinaron que 193 de 209 virus aislados de influenza A (H3N2) en pacientes mostraron un cambio en los aminoácidos 31 en el gen M2 que confiere resistencia a los adamantanos (Bright *et al.,* 2006). Por lo tanto, la amantadina y rimantadina no se recomiendan para el tratamiento antiviral o profilaxis frente a cepas del virus de influenza A. El virus Influenza A(H1N1)pdm09 es resistente a la amantadina y rimantadina (WHO, 2010), reportándose que la mutación S31N es la responsable de esta resistencia (Dawood *et al.,* 2009).

e. Impacto sanitario de la gripe

Durante la pandemia del virus Influenza A(H1N1)pdm09 cerca de 214 países reportaron casos confirmados de la gripe incluyendo 18,449 muertes. En el Perú, se notificaron más de 10 000 casos confirmados y 312 fallecidos afectando a niños y adultos jóvenes relacionados en su mayoría con comorbilidades o condición de riesgo (Suárez, 2011). Desde ese entonces la OMS recomienda la vigilancia epidemiológica de la influenza. Entre los años 2015-2016, se detectaron 788 virus de influenza A(H1N1)pdm09 en el Perú según el Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorios del INS, de 45 defunciones por Influenza el 86% fue por el virus de influenza A(H1N1)pdm09 durante el 2016, asociadas con comorbilidad (Medina, 2016). Hasta la semana epidemiológica número 45 del 2016 en el Perú, se ha identificado 1177 casos de virus influenza, con el 55,6% (655) por influenza A(H1N1)pdm09 y el 8,9% (105) a influenza A (H3N2) (Medina, 2016).

El impacto en los servicios de salud ha generado malestar en las empresas reduciendo la productividad laboral debido a los brotes o epidemias estacionales a causa de este virus.

f. Metodologías para el análisis molecular de genomas virales

Los genomas virales por su alta capacidad de replicación generan especies o cuasiespecies que en el tiempo se pueden adaptar y ser éxitosas, generando en ocasiones nuevos subtipos de impacto en la salud pública. La caracterización de estos genomas virales tiene la finalidad de contribuir con la vigilancia genómica, evaluando las variaciones, reordenamientos, nuevos linajes y genotipos que son de impacto epidemiológico y clínico según el nivel de variaciones que estos puedan presentar; así mismo como estas variaciones pueden influir en el diagnóstico molecular. Con el origen de la pandemia generada por el virus SARS-CoV-2, se ha generado una basta producción científica enfocada en el estudio de genomas virales, en estos estudios se han optimizado las metodologías para la caracterización de los genomas virales. Multiples estudios utilizan el secuenciamiento de fragmentos o el genoma completo de los virus para realizar vigilancia de influenza. Estos estudios describen diferentes protocolos de amplificación, tecnologías de secuenciamiento (Sanger, NGS, nanoporos), y métodos de análisis bioinformático.

Una de las primeras metodologías para caracterizar genomas de influenza H1N1 es la propuesta por Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team (2009); el cual propone realizar la amplificación fragmentos sobrelapantes de 200 a 250 pb para luego secuenciar estos fragmentos usando el kit de secuenciamiento BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems) y un secuenciador automatico basado en capilares ABI 3500 (Applied Biosystems) hasta completar genoma total de influenza A(H1N1). El análisis bioinformatico de estos fragmentos utiliza el software Sequencher versión 4.7 (Gene Codes) para realizar el ensamblado del genoma, el análisis filogenético es realizado usando el software GARLI 0.96b7 y el método de Maximum-Likelihood, mientras la visualización del árbol filogenético fue realizada mediante TreeView version 1.6.6. Esta misma metodología fue adaptada para caracterizar el genoma completo A(H1N1)pdm09 del 2013 circulante en el Perú por Padilla *et al*. (2014), introduciendo algunos cambios como el uso del software SeqScape y un alineamiento de las secuencias usando software

MEGA versión 5.2 para la para la detección de las variantes en comparación con la cepa vacunal A/California/07/2009.

Barrero *et al.* (2010), realiza el secuenciamiento de los segmentos HA, NA y M, mediante la amplificación con los cebadores establecidos por Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team (2009). El alineamiento es realizado mediante el software ClustalX (version 2.012) y editado manualmente con el programa BioEdit (version 7.0.5.3). El análisis filogenético es realizado mediante Neighbor-Joining analysis con 1,000 bootstraps en el software MEGA (versión 4.0), y mediante Filogenia Bayesiana usando el software Mr. Bayes (version 3.1; 20,000,000 ngen, 5,000 samplefreq, 4 nchains, 5,000 burnin) previa evaluación del modelo de sustitución nucleotídica usando el software Jmodeltest. Adicionalmente la inferencia filogenética es realizada mediente el algoritmo Mobyle@Pasteur (http://mobyle.pasteur.fr), el ancestro común mas reciente (MRCA) para HA y NA es realizado mediante MCMC aplicando el reloj molecular estricto usando el software BEAST (version 1.4.8); y visualizados mediante el software FigTree (version 1.2.3). las secuencias fueron alineadas mediante el software Seqscape (version 2.7; Applied Biosystems), en comparación con la cepa referencial California/04.

Li *et al.* (2013), realiza la amplificación de los segmentos mediante los cebadores establecidos por Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team (2009) usando el secuenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA), se uso el software Seqman software in DNAStar (version 5.01) para el splicing de los productos secuenciados. El alineamiento fue realizado mediante el algoritmo de ClustalW, y el porcentaje de identidad fue realizado en base a la cepa de referencia usando Megalign del software DNAStar (version 5.01). El árbol filogenético fue contruido usando el método Neighbor-Joining de MEGA (versión 4.0.1), la taza de sustitución es realizada mediante MCMC (software BEAST v1.7.5).

Zhou *et al.* (2009), establecen el estudio del genoma completo de virus influenza A, independientemente del subtipo en base a la amplificación en un solo paso

utilizando solo dos cebadores, acelerando la amplificación de los ocho segmentos (multisegmento: M-RTPCR) aprovechando la característica del genoma viral de contener 12 nucleótidos en el extremo 3′ y 13 nucleótidos en el extremo 5′ que son conservados y complementarios. Esta metodología optimiza el proceso de amplificación del genoma completo, siendo esta metodología utilizada para posteriores análisis de genoma completo de influenza A.

Los avances tecnológicos en secuenciamiento, llevó a la implementación de nuevas metodologías como el secuenciamiento de nueva generación, cuya plataforma optimiza el secuenciamiento de genomas completos de forma mas eficiente y rápida; sin embargo, esta tecnología requiere del uso de herramientas bioinformáticos de mayor complejidad.

Mena *et al.* (2016), propone el secuenciamiento por NGS mediante la amplificación del genoma completo en base a multi-segmentos RT-PCR, y purificación mediante perlas AMPure XP (Beckman Coulter), cortando los fragmentos de 150pb mediante sonicador y su posterior reparación de los extremos para luego preparar las librerías mediante NEBNext DNA de Illumina secuenciando con la plataforma HiSeq 2500 en single-end. El análisis bioinformatico fue realizado mediante ensamblaje *de novo* con Trinity (Grabherr *et al*., 2011) y Burrows-Wheeler Alignment (BWA) tool (Li y Durbin, 2009), la anotación de los segmentos es realizado mediante NCBI Influenza Virus Sequence Annotation Tool (Bao *et al.*, 2007). Para el análisis filogenético es realizado con el método Neighbor-Joining de PAUP v4.0b10 (http://paup.csit.fsu.edu) y la relafición filogenética fue realizada para cada segmento con MCMC mediante el programa BEAST v1.8.2 (Drummond et al., 2012) y con RAxML v7.2.6 (Stamatakis, 2006).

Lee (2020), consolida diversas metodologías para el secuenciamiento completo de genomas del virus influenza A, como el uso de la amplificación multisegmento usando 3 primers; recomendando el secuenciamiento de librerías de fragmentos usando las plataformas MiSeq (o MiseqDx) de Illumina; y las plataformas Ion Torrent

PGM (o Ion Proton) de Life Technologies. Mientras que para el análisis bioinformático recomienda el uso de diversos programas a ser instalados en el entorno Linux para el filtrado por calidad de los reads (Sickle, Trimmomatic, SAMtools, BFCtools, entre otros) obtenidos para luego ensamblar genomas completos usando una estrategia *de novo* (por ejemplo, Spades) o por un método asistido por genoma de referencia (por ejemplo, Bowtie2).

Chao *et al.* (2021), plantea realizar el secuenciamiento de genomas de influenza usando la plataforma MinION a partir de ARN (Keller et al. 2018) usando la celda de flujo FLO-MIN106 equipado con la química R9.4 y con cDNA usando la celda de flujo FLO-MIN107 (R9.5). La conversión de los archivos con información de las secuencias Fast5 a FASTQ es realizada mediante Albacore v2.0.2 (Oxford Nanopore Technologies), y estos a FASTA mediante FASTX-Toolkit v0.0.14, la anotación es realizada mediante NCBI Influenza Virus Sequence Annotation Tool (Bao *et al.*, 2007). El análisis bioinformático fue realizado mediante Maximum Likelihood estimado por RAxML-HPC2 on XSEDE (Miller *et al.* 2010).

Owuor *et al.* (2019), establece realizar el secuenciamiento por NGS mediante la amplificación del genoma por M-RTPCR, purificando con AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc), y llevando a una concentración de 0.2 ng/µL los productos. Para la preparación de la librería se usó Nextera XT (Illumina) y purificando las librerías mediante perlas magenéticas (AMPure XP), el pooling de librería es denaturado secuenciado con el equipo MiSeq (Illumina). El análisis bioinformático es realizado con los algoritmos de Iterative Refinement Meta-Assembler (IRMA) (Shepard *et al.* 2016), Lineage Assignment By Extended Learning (LABEL) (Shepard *et al.* 2014), Striped Smith-Waterman (SSW) (Zhao *et al.* 2013), EDGE Bioinformatics environment (Li *et al.* 2017), la filogenia fue realizada mediante maximun likelihood.

Takayama *et al.* (2021), en su estudio propone la amplificación del todo el genoma en base a M-RTPCR (Zhou *et al.* 2009), utilizando el protoloco para la preparación de librerías de NEBNext Ultra II DNA library (New England BioLabs,

Ipswich, MA), con el reactivo de MiSeq v3 (150 ciclos) (Illumina, San Diego, CA) usando el equipo secuenciador MiSeq. Para el análisis bioinformático se usaron los programas FLUGAS software (version 11, World Fusion, Tokyo, Japan), CLC Genomics Workbench (version 11, Qiagen) y el análisis fiogenético fue realizado mediante MEGA, version 7.0 con el método de neighbor-joining method.

Estos estudios han enriquecido los bancos de datos de las secuencias genómicas, y de esa manera contribuido a conocer mas sobre la evolución y filogenia del virus influenza en el mundo.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hlipótesis

En el Perú circulan cepas de Influenza A(H1N1)pdm09 filogenéticamente relacionados entre sí, que van acumulando mutaciones en su genoma que modifican su antigenicidad y resistencia a antivirales.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Caracterizar el genoma completo del virus Influenza A(H1N1)pdm09 que circuló en el Perú durante 2015-2016.

3.2.2. Objetivos específicos

- Determinar los genotipos más frecuentes del virus Influenza A(H1N1)pdm09 del Perú durante los años 2015 – 2016, mediante la técnica de HRM para el gen de Hemaglutinina y de la Matriz.

- Construir el árbol filogenético del virus Influenza A(H1N1)pdm09 utilizando el genoma total de cepas circulantes en el Perú durante los años 2015 – 2016.

- Identificar las variantes antigénicas en 8 segmentos del genoma viral de Influenza A(H1N1)pdm09.

- Análisis estructural *in silico* la proteína Hemaglutinina y Neuraminidasa de los aislamientos de influenza circulantes en el 2015-2016.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El tipo de estudio realizado esta enmarcado en ciencia básica, descriptiva.

4.1. MATERIALES

4.1.1. Material biológico.

Muestras positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09 provenientes de hisopado nasal y faringeo (HNF) recepcionadas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorio (LRNVR) del Instituto Nacional de Salud entre el 2015 y 2016.

4.1.2. Población de estudio

Las muestras recibidas durante los años 2015-2016 a través del sistema nacional de vigilancia de "Influenza y otros Virus Respiratorios", procedieron de todas las regiones del país, y se encuentran almacenadas en la viroteca del LRNVR del INS. Todas las muestras son anónimas y no se usaron los datos del paciente en el presente estudio, todas fueron codificadas.

4.1.3. Selección de muestras

Para la determinación de los genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 se seleccionaron todas las muestras positivas que cumplian los criterios de elegibilidad, seleccionando asi 287 muestras positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09.

Para la secuenciación del genoma completo del virus influenza A(H1N1)pdm09, se tomó 2 muestras de manera aleatorizada de cada genotipo determinado.

4.1.4. Criterios de elegibilidad

Criterios de Inclusión:

- Muestras de hisopados nasal y faríngeo, diagnosticadas como positivas para el virus de influenza A(H1N1)pdm09 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real.

- Muestra de hisopado nasal y faríngeo con un valor Ct del RT-PCR en tiempo real menor a 25.

Criterios de Exclusión:

- Muestras cuyos datos no estén completos en el SISTEMA DE NETLAB.
- Muestras que posean un valor Ct del RT-PCR en tiempo real mayor o igual a 25.

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Determinación de genotipos por High Resolution Melting

a) Extracción de ARN viral

Para la extracción del ARN, a partir de las muestras de hisopado nasal y faríngeo seleccionadas bajo los criterios de elegibilidad, se empleó una alícuota de 140 µL para cada extracción, con un volumen de elución final de 60 µL. El ARN viral se obtuvo utilizando el purificador de ácidos nucleicos automátizado QIAcube (QIAGEN) con el kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Handbook (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

b) Análisis High Melting Resolution para determinar los genotipos del virus Influenza A (H1N1) pdm09

Para este análisis, se diseñó los primers para el gen de hemaglutinina: HA-F (5´-CCC AAA GTR AGR GAT CAR GA-3´) y HA-R (5´-CCC TTG GGT GTY TGA CAY KT-3´) usando el programa BatchPrimer3 v1.0. Para analizar el gen de la Matriz se usó los primer IFU-F (5 '-GCG AGG ACT GCA GCG TAG AC-3') y IFU-R (5'- 'TGA GAC CCA TGC AAC TGG CAA G-3') previamente reportados (Lin *et al.,* 2008).

Se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa, para ello se mezcló 0,5 µL de los primers reversos a 10 µM (HA-R y IFU-R) cada uno, 1 µL de 10 mM dNTP, 5 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de ARN; luego se denaturó esta mezcla por 5 minutos a 65 ºC. Para la síntesis del cDNA se añadió a la mezcla anterior 8 µL de la

reacción de transcripción reversa RT (obtenida mezclando 4 µL de 5X buffer RT, 2 µL de 0,1 M DTT, 1,75 µL de agua libre de nucleasas y 0,25 µL de enzima RT SuperScript II), los tubos de reacción se incubaron a 42 ºC por 50 minutos y se inactivó la reacción a 70 ºC por 15 minutos en un termociclador convencional (Applied Biosystems).

Para realizar el análisis de High Resolution Melting se utilizó el Mix para de HRM de QIAGEN, para ello se mezcló 5 µL de Master Mix de amplificación HRM 2X, 1,4 µL de mix de primer (HA-F/HA-R para HA y IFU-F/IFU-R para M) a 5 µM, 2 µL de cDNA y 1,6 µL de agua de PCR. Se colocó los tubos de reacción en un termociclador en tiempo real RotorGene Q (Qiagen) y se aplicó el siguiente programa de amplificación: denaturación inicial de 95 °C por 5 minutos, 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, seguido de un ciclo de calentamiento y adquisición de señal de flourescencia (High Resolution Melting) de 65 °C a 95 °C a una velocidad de 0,1 °C/segundo, con adquisición en el canal GREEN. Para analizar los perfiles de HRM se usó el software HRM analysis v 2.3.1 de RotorGene, se normalizó las curvas para el gen HA la región 1 fue de 76-78 y la región 2 de 85-87, para el gen M la región 1 fue de 76-78 y la región 2 de 84-86 con un Threshold del 70% para ambos genes.

Adicionalmente, en cada experimento se utilizó como controles positivos los aislamientos de influenza A(H1N1)pdm09 los cuales son utilizadas de forma rutinaria para el diagnóstico molecular por el LRNVR-INS, y se utilizó como control de contaminación un tubo con la mezcla de reacción sin añadir material genético.

c) Análisis estadísticos

Se aplicó estadística descriptiva mediante la elaboración de la tabla de contingencia – Prueba de Chi Cuadrado de Pearson usando el paquete estadístico Info Stat – Statistical Software Versión 5.13.1 (https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=15).

4.2.2. Secuenciación del genoma completo de influenza A (H1N1)pdm09

a) Muestras seleccionadas

Se seleccionaron de forma aleatoria dos muestras de hisopado nasal y faríngeo correspondientes a cada genotipo identificado por HRM.

b) Extracción de ARN viral

Para la extracción del ARN a partir de una alícuota de 140 µL de hisopado nasal y faríngeo se usó el purificador de ácidos nucleicos automatizado QIAcube (QIAGEN) con el kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Handbook (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN fue eluido en volumen final de 60 µL.

c) Amplificación por M-RTPCR del genoma completo de Influenza A(H1N1)pdm09

- **M-RTPCR convencional**

Se amplificó el genoma completo del virus Influenza A(H1N1)pdm09, usando los primers MBTuni-12 (5'-ACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG-3') y MBTuni-13 (5'-ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG-3') (Zhou *et al.,* 2009), en un termociclador 9700-Gene Amp (Applied Biosystems).

- Preparación de la mezcla de reacción:

Reactivos	**1X**
Agua de PCR	2
Buffer de PCR 2X	12.5
Primer MBTuni-12, 10 µM	0.5
Primer MBTuni-13, 10 µM	0.5
DTT	0.5
Mix SSIII/Taq Platinum	1
TOTAL	**17** µL
ARN	**8** µL

- Ciclaje:

1 ciclo	42 °C por 40 minutos 50 °C por 60 minutos 94 °C por 2 minutos
5 ciclos	94 °C por 30 segundos 45 °C por 30 segundos 68 °C por 3 minutos
31 ciclos	94 °C por 30 segundos 57 °C por 30 segundos 68 °C por 3 minutos
1 ciclo	68° C por 10 minutos
	4 °C continuos.

- **Electroforesis en gel de agarosa**

Se preparó geles para electroforesis a una concentración de 1,5% de agarosa en tampón TAE 1X. Se mezcló 5 µL de los productos de amplificación con 1 µL del buffer de carga (Azul de bromofenol) y para determinar los tamaños observados en el gel se usó un marcador de ADN ladder 1 Kb (PROMEGA), la corrida se realizó usando la fuente de poder PowerPac Universal Power Supply (Bio-Rad) aplicando 120 voltios durante 60 minutos. Se tiñeron los geles con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL y se visualizó en el UV-transluminador modelo 2000 (BioRad).

- **Purificación de los productos de PCR**

La purificación de los productos de PCR se realizó usando un Kit de purificación de productos de PCR basado en columna de silica de Thermo Scientific siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos fueron almacenados a -20 °C.

- **Cuantificación del producto de PCR purificados**

La cuantificación de los productos de PCR se realizó mediante el uso del Kit de ensayo Qubit® dsDNA HS Assay Kit (siguiendo el protocolo del fabricante). Las concentraciones obtenidas fueron llevadas a 0,2 ng/µL.

- **Secuenciación del genoma completo**

Se realizó una reacción de secuenciación del genoma completo por secuenciación masiva siguiendo el protocolo de Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina) para las librerías partiendo de una concentración inicial de las muestras de 0,2 ng/µL. Para la amplificación de genomas pequeños se usó Miseq® Reagent Kit V2.

Tagmentación del ADN

El proceso de tagmentización se realizó a partir de 1 ng de los productos amplificados, para ello el ADN fue mezclado con el reactivo TD y el reactivo ATM e incubado a 55 °C por 5 minutos, luego la reacción es detenida utilizando el reactivo NT. Durante este procedimiento se realiza la fragmentación del ADN y adición de unas secuencias en el extremo que son de unión a los index.

Amplificación fragmentos por PCR

Los fragmentos producidos fueron amplificados para incorporar los index en cada librería de fragmentos, para ello se mezcló los fragmentos con el reactivo NPM y una combinación de los index i5 e i7 para luego ser sometido a un programa de temperaturas (72 °C por 3 minutos, 95 °C por 30 segundos, 12 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, y una extensión de 72 °C por 5 minutos) en un termociclador.

Purificación de la librería de fragmentos

Las librerías de fragmentos fueron purificadas mezclando las librerías de fragmentos con perlas magnéticas de purificación AMPure XP (Beckman Coulter) a una proporción de 0.8x, luego las librerías de fragmentos unidas a las perlas magnéticas son lavadas usando etanol al 80% y las librerías de fragmentos fueron eluidos en buffer de resuspensión RB.

Verificación del tamaño de fragmentos de la librería

Para verificar el tamaño de los fragmentos de las librerías se realizó electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, para ello se mezcla 5 µL de las

librerías de fragmentos con 1 µL de 6X buffer de cargado de muestras. Se espera verificar que los fragmentos de las librerías presente un tamaño entre 250 y 1000pb.

Normalización de las librerías de fragmentos

Para asegurar una representación homogénea de las librerías en el pool, se mezcló las librerías de fragmentos con las perlas LNB1 y el reactivo LNA, se mezcló esta preparación por 30 minutos en agitador de placa a 3500 rpm. Luego estas perlas son lavadas con el reactivo LNW1, y la librería es denaturada con 0.1 N NaOH por 5 minutos y luego neutralizada la muestra usando LNS1.

Pooling de las librerías de fragmentos

Las librerías de fragmentos normalizadas fueron mezcladas en cantidades equimolares y diluidas a una concentración 12.5 pM en solución HT1 y denaturados por calor y su posteriormente incorporación del control phiX.

Cargado de las librerías al secuenciador

Para el cargado del pool de librerias se colocó los 600 µL del pool a 12.5 pM dentro del pocillos para la muestra de un cartucho V2 por 500 ciclos para el secuenciador Miseq.

El secuenciador Miseq (Illumina) es preparado colocando una celda de flujo compatible con el cartucho V2 por 500 ciclos y seleccionando el archivo con datos de las muestras (Sample Sheet) previamente preparado con el programa Illumina Experiment Manager IEM (Illumina) con los códigos de las muestras y los index utilizados. Luego, se colocó el cartucho cargado en el equipo y se inició el proceso en el secuenciador.

Parámetros de resultados

El *Q score:* es la probabilidad de 1 error en una base siendo esta tomada como la medicón de calidad, esta es calculada después del ciclo 25, siendo el rango óptimo de 70% - 100%.

Cluster density (K/mm2): es el número de clusters por milímetro al cuadrado, con un rango óptimo de 1000 – 1200.

Cluster passing filter (%): es el porcentaje de cluster que pasan el filtro hasta 75%, con un rango óptimo de 85 a 95%.

- **Análisis bioinformático**

El análisis bioinformático se realizó usando la plataforma Linux, con el uso de diferentes herramientas bioinformáticas (Tabla 2), para el análisis de las secuencias obtenidas en formato FastQ y usando el genoma de referencia (Tabla 1).

Tabla 1. Metadata del virus Influenza A/California/07/2009(H1N1)

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Kb)	GC%	Protein	Gene
Chr	5	NC_026436.1	FJ969536.1	1.5	46.2	1	1
Chr	7	NC_026431.1	FJ969537.1	0.98	47.1	2	2
Chr	8	NC_026432.1	FJ969538.1	0.86	43.6	2	2
Chr	4	NC_026433.1	FJ969540.1	1.7	40.8	1	1
Chr	3	NC_026437.1	FJ969539.1	2.15	44.2	2	2
Chr	6	NC_026434.1	FJ984386.1	1.41	42.1	1	1
Chr	2	NC_026435.1	GQ323558.1	2.27	42.0	1	2
Chr	1	NC_026438.1	FJ984387.1	2.28	44.8	1	1

Fuente: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=A%2FCalifornia%2F07%2F2009(H1N1)

Tabla 2. Programas usados para el análisis bioinformático

	Programa	Referencia	Aplicación
Evaluación de calidad	FasqC	Lee *et al.*, 2020	Visualización de calidad
Limpieza de adaptadores	ea-utils	Aronesty *et al.*, 2011	Limpieza de adaptadores
Control de calidad	Sickle	Joshi *et al.*, 2011	Filtrado por calidad
Ensamblaje	SPAdes	Bankevich *et al.*, 2012	Ensamblaje
	Quast	Gurevich *et al.*, 2013	Estadistica del ensamblado
Edición manual	CONTIGuator	Galardini *et al.*, 2011	Reordenamiento de contig
	bio-bwa	Li y Durbin, 2009	Mapeo de reads
	Samtools	Li *et al.*, 2009	SAM a BAM
	Samtools	Li *et al.*, 2009	Limpieza de read duplicados y ordenamiento de reads
	IGV	Robinson *et al.*, 2011	Visualización de reads
	MEGA-7	Kumar *et al.*, 2016	Visualización de genoma borrador
	Gblocks	Talavera *et al.*, 2007	Cortar los genomas alineados
Análisis filogenético	JmodelTest2	Darriba *et al.*, 2012	Modelo de sustitución
	BEAST	Drummond *et al.*, 2012	MCMC
	Tracer	Rambaut *et al.*, 2018	Convergencia de datos
	TreeAnnotator	Drummond *et al.*, 2012	Obtención del árbol mas creible
	FigTree	Drummond *et al.*, 2012	Visualización y edición del árbol filogenético
Identificación de Variantes	Samtools	Li *et al.*, 2009	Creación de índice para reads alineados Cálculo de las coberturas por base
	Bcftools	Li *et al.*, 2011	Llamado de variantes en formato vcf
	Vcfutils.pl	Danecek *et al.*, 2011	Filtrado de variants por calidad
	SnpEff	Cingolani *et al.*, 2012	Identificación de variantes

Limpieza y control de calidad de los archivos Fastq

Para ver la calidad de los reads analizados se usó el programa FastQC (Lee *et al*., 2020) usando la plataforma de BaseSpace-Illumina (https://basespace.illumina.com).

Se usó el programa ea-utils (Aronesty *et al*., 2011) (https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/) para la eliminación de los index.

```
# fastq-mcf adapter.fasta R1_001.fastq R2_001.fastq -o R1_filtrado.fastq -
  o R2_filtrado.fastq -C 1000000 -q 10 -p 10 -u -x 0.01
```

Para el filtrado de los reads con calidad se usó el programa sickle (Joshi *et al*., 2011) (https://github.com/najoshi/sickle) usando los reads filtrados libres de index.

```
# sickle pe -g -t sanger -f R1_filtrado.fastq.gz -r R2_filtrado.fastq.gz -o
  R1_trim.fastq.gz -p R2_trim.fastq.gz -s singles.fastq.gz -q 30
```

Ensamblado del genoma del virus Influenza A (H1N1)pdm09

Para el ensamblaje del genoma se usó el programa SPAdes-3.11.1-linux (Bankevich *et al*., 2012) (https://github.com/ablab/spades) usando los reads filtrados y con calidad (trim.fastq), usando k-mers de 7,9,11,15,21.

```
# spades.py -k 7,9,11,15,21 --pe1-1 R1_trim.fastq --pe1-2 R2_trim.fastq -
  o ensamble
```

Para ver los datos estadísticos del ensamblado se utilizó el programa Quast v4.0 (Gurevich *et al*., 2013) (http://quast.sourceforge.net/install.html)

```
Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 1
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg1.fasta -o quast_seg1

Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 2
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg2.fasta -o quast_seg2

Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 3
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg3.fasta -o quast_seg3

Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 4
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg4.fasta -o quast_seg4

Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 5
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg5.fasta -o quast_seg5

Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 6
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg6.fasta -o quast_seg6

Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 7
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg7.fasta -o quast_seg7

Llamado de los datos estadísticos del ensamblado del genoma segmento 8
#    quast.py ensamble/contig.fasta -r H1N1_seg8.fasta -o quast_seg8
```

Edición manual del genoma del virus Influenza A (H1N1)pdm09

Los contigs generados por el programa SPAdes fueron ordenados con el programa CONTIGuator_V2.7 (Galardini *et al.*, 2011), este programa ordena los contigs con respecto al genoma de referencia por segmentos, de tal forma que se obtiene un genoma preliminar o borrador el cual es corregido por edición manual.

```
Edición H1N1 segmento PB1
# CONTIGuator.py -r H1N1_seg1.fasta -L 700 -B 800 -c ./ensamble/H1N1

Edición H1N1 segmento PB2
# CONTIGuator.py -r H1N1_seg2.fasta -L 700 -B 800 -c ./ensamble/H1N1

Edición H1N1 segmento PA
# CONTIGuator.py -r H1N1_seg3.fasta -L 700 -B 800 -c ./ensamble/H1N1

Edición H1N1 segmento HA
# CONTIGuator.py -r H1N1_seg4.fasta -L 700 -B 800 -c ./ensamble/H1N1
```

```
Edición H1N1 segmento NP
# CONTIGuator.py -r H1N1_seg6.fasta -L 700 -B 800 -c ./ensamble/H1N1

Edición H1N1 segmento M
# CONTIGuator.py -r H1N1_seg7.fasta -L 700 -B 800 -c ./ensamble/H1N1

Edición H1N1 segmento NS
# CONTIGuator.py -r H1N1_seg8.fasta -L 700 -B 800 -c ./ensamble/H1N1
```

Para realizar la edición manual es necesario visualizar los reads filtados y ordenados con respecto al genoma de referencia. Es por ello, los archivos fastq fueron filtrados por calidad y mapeandos con respecto al genoma de referencia usando el programa bio-bwa v.0.7.12 (Li y Durbin, 2009) (https://sourceforge.net/projects/bio-bwa) generándose los archivos SAM por cada segmento. Se transformó el archivo en formato SAM al formato BAM usando el programa Samtools v.0.1.19 (Li *et al*., 2009) (https://sourceforge.net/projects/samtools/) este programa además nos permitio hacer una limpieza de los reads duplicados asi como ordenar los reads con respecto al genoma de referencia usando la opción sorted generándose los archivos sorted.rmdup.bam.

```
Creación de índice para el genoma de referencia por segmento
#   bwa index H1N1_seg1.fasta

Alinear los read con respecto al genoma de referencia por segmento
#   bwa mem -t 2 H1N1_seg1.fasta R1_trim.fastq R2_trim.fastq >
    H1N1_seg1.sam

Convertir archivo de salida SAM a um formato BAM por segmento
#   samtools view -bS -T H1N1_seg1.fasta H1N1_seg1.sam >
    H1N1_seg1.bam

Ordemiento de los read alineados em el genoma de referencia por segmento
#   samtools sort H1N1_seg1.bam H1N1_seg1.sorted
```

```
Remoción de reads duplicados por segmento
#   samtools rmdup H1N1_seg1.sorted.bam H1N1_seg1.sorted.rmdup.bam

Creación del archivo bam.bai por segmento
#   samtools view --write-index H1N1_seg1.sorted.rmdup.bam.sam -o
    H1N1_seg1.out.bam.bai
```

Se realizó una edición manual del genoma borrador usando el programa MEGA-7 (Kumar *et al*., 2016) y visualizando los reads ordenados del archivo BAM con el visualizador IGV (Robinson *et al*., 2011) (https://software.broadinstitute.org/software/igv/AlignmentData), los genomas editados en formato FASTA, fueron usados para el análisis filogenético.

Análisis filogenético: Árbol filogenético del virus Influenza A (H1N1) pdm09 utilizando el genoma total de cepas circulantes en el Perú durante los años 2015 – 2016.

Para el análisis filogenético, se descargó 40 genomas completos de aislamientos relevantes de influenza A(H1N1)pdm09 de la base de datos GISAID (https://www.gisaid.org/). Luego, se realizó el alineamiento de los genomas de la base de datos y los obtenidos en esta investigación en formato FASTA por segmento usando el software MEGA-7 (https://www.megasoftware.net) tomando como referencia el genoma A/California/07/2009/(H1N1), los extremos de los genomas alineados fueron cortados usando el programa en línea Gblocks (Talavera *et al*., 2007) (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) generando un archivo multi FASTA.

El análisis filogenético se realizó utilizando inferencia bayesiana a través de las cadenas de Markov (MCMC) usando el programa BEAST v2.5.0 (Drummond *et al.,* 2012) (https://www.beast2.org/), para escoger el mejor modelo de sustitución para cada segmento se usó el programa jModelTest-2.1.10 (Darriba *et al*., 2012) (https://github.com/ddarriba/ jmodeltest2). Se usó un modelo de reloj molecular

estricto. Se usaron dos modelos de árboles Bayesian Skyline y Yule Model. La longitud de la cadena MCMC fue de 632 000 millones. La convergencia de los datos fue analizada con el programa Tracer v2 (Rambaut *et al.*, 2018) (https://www.beast2.org/tracer-2/), para la obtención del árbol más creible se usó TreeAnnotator v2.5.0 (Drummond *et al.*, 2012) (https://www.beast2.org/) La visualización y edición del árbol se realizó usando FigTree v1.4.2 (Drummond *et al.*, 2012) (https://beast.community/figtree).

Identificación de variantes antigénicas en aminoácidos de los 8 segmentos del genoma viral de Influenza A (H1N1) pdm09.

Para ver las variantes del genoma se usó los programas Samtools v.0.1.19 (Li *et al.*, 2009) (https://sourceforge.net/projects/samtools/), bcftools (Li *et al.*, 2011) (https://github.com/samtools/bcftools) que genera un archivo .vcf donde se observa las variantes encontradas en base al genoma de referencia por base nucleotídica y vcfutilis (Danecek *et al.*, 2011) para filtrar las variantes con calidad mayor a 20.

```
Creación de índice para los read alineados al genoma de referencia
#   samtools index H1N1_seg1.sorted.rmdup.bam

Cálculo de las cobertura por base
#   samtools mpileup -uD -f H1N1_seg1.fasta H1N1_seg1.sorted.rmdup.bam -o
    H1N1_seg1.raw.vcf

Llamado de variantes en formato vcf
#   bcftools call -mv -Ov -Vindels -o H1N1_seg1.called.vcf H1N1_seg1.raw.vcf

Filtrado de variants por calidad
#   vcfutils.pl varFilter -d 20 -Q 20 H1N1_seg1.called.vcf >
    H1N1_seg1.called.filt.vcf
```

Para la determinación si el cambio nucleotídico ha generado una mutación aminoacídica no sinónima se usó el programa snpEff (Cingolani *et al.*, 2012) (http://snpeff.sourceforge.net/) que utiliza el archivo .vcf que contiene las variantes

nucleotidicas comparandolas con el genoma de referencia anotado por cada uno de los segmentos.

```
Llamado de variants aminoacídicas para el segmento PB1
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c
    /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_PB1 seg1.called.filt.vcf >
    seg1.called.filt.ann.vcf

Llamado de variants aminoacídicas para el segmento PB2
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c
    /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_PB2 seg2.called.filt.vcf >
    seg2.called.filt.ann.vcf

Llamado de variants aminoacídicas para el segmento PA
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c
    /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_PA seg3.called.filt.vcf >
    seg3.called.filt.ann.vcf

Llamado de variants aminoacídicas para el segmento HA
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c
    /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_HA seg4.called.filt.vcf >
    seg4.called.filt.ann.vcf

Llamado de variants aminoacídicas para el segmento NP
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c
    /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_NP seg5.called.filt.vcf >
    seg5.called.filt.ann.vcf

Llamado de variants aminoacídicas para el segmento NA
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c /home
    /snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_NA seg6.called.filt.vcf >
    seg6.called.filt.ann.vcf

Llamado de variants aminoacídicas para el segmento M
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c /home
    /snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_M seg7.called.filt.vcf >
    seg7.called.filt.ann.vcf

Llamado de variants aminoacídicas para el segmento NS
#   java -Xmx4g -jar /home/snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.jar -c /home
    /snpEff_latest_core/snpEff/snpEff.config -v H1N1_NS seg8.called.filt.vcf >
    seg8.called.filt.ann.vcf
```

Análisis estructural *in silico* la proteína Hemaglutinina y Neuraminidasa de los aislamientos de influenza circulantes en el 2015-2016.

La secuencia obtenida en nucleótidos de Hemaglutinina y Neuraminidasa fue traducida usando el programa en línea translate ExPasy (https://web.expasy.org), la predicción de la proteína se realizó usando el servidor en linea RaptorX (Wang et al., 2016) (http://raptorx.uchicago.edu/), para calcular la precisión de la estructura proteica en base teórica calculando el índice de Ramachandram se usó el servidor en línea molprobity (http://molprobity.biochem.duke.edu/), y para la visualización de la proteína modelada se usó el programa PyMol (https://pymol.org/2/). Las estructuras proteicas modeladas obtenidas fueron comparadas con la estructura de la cepa vacunal A/California/07/2009 que también fue modelada.

V. RESULTADOS

5.1. Determinación de genotipos de influenza A(H1N1)pdm09 mediante High Resolution Melting

Durante el periodo de estudio, 788 muestras (133 muestras del 2015 y 655 del 2016) fueron positivas a influenza A(H1N1)pdm09 por RT-PCR en tiempo real diagnosticadas por el LRNVR-INS. De estas muestras positivas solo 287 muestras (31 muestras del 2015 y 256 del 2016) cumplían con los criterios de selección para el análisis de HRM (Tabla 3), los cuales están distribuidos a nivel de todos los departamentos del Perú según se observa en la Figura 1 y Tabla 3.

El número de muestra seleccionadas presentó diferentes frecuencias según el grupo etario: 23% (66) eran menores de 5 años, 13,2% (38) tenían entre 5 – 11 años, 1,7% (5) tenían entre 12 – 18 años, 50,5% (145) tenían entre 18 – 59 años y 11,5% (33) eran mayores de 60 años. Además, el número de muestra presentó una pequeña diferencia de frecuencias según el sexo: 48,1% (138) fueron de sexo femenino y 51,9% (149) masculino. Asimismo, el número de muestra presentó diferencias de frecuencias según su clasificación clínica: 33,8% (97) eran casos de Enfermedad Tipo Influenza (ETI), 54% (155) eran casos de Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) y 12,2% (35) eran casos de IRAG inusitado.

Tabla 3. Casos positivos de Influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015 - 2016 según departamentos.

DEPARTAMENTO	Influenza A(H1N1)pdm09 2015		Influenza A(H1N1)pdm09 2016	
	Casos Totales	Casos Seleccionados	Casos Totales	Casos Seleccionados
Amazonas	0	0	7	3
Áncash	8	1	9	4
Apurímac	0	0	8	2
Arequipa	10	0	145	64
Ayacucho	8	0	9	2
Cajamarca	6	2	11	5
Cusco	12	9	21	2
Huancavelica	4	2	0	0
Huánuco	1	0	3	2
Ica	1	0	9	3
Junín	9	0	17	7
La Libertad	14	5	21	15
Lambayeque	15	7	28	9
Lima	28	5	132	53
Loreto	0	0	27	2
Madre de Dios	0	0	6	2
Moquegua	0	0	5	1
Pasco	0	0	2	1
Piura	0	0	131	43
Puno	3	0	23	14
San Martín	0	0	4	2
Tacna	3	0	8	5
Tumbes	11	0	26	14
Ucayali	0	0	3	2
TOTAL	**133**	**31**	**655**	**256**

Fuente: LRNVR-INS

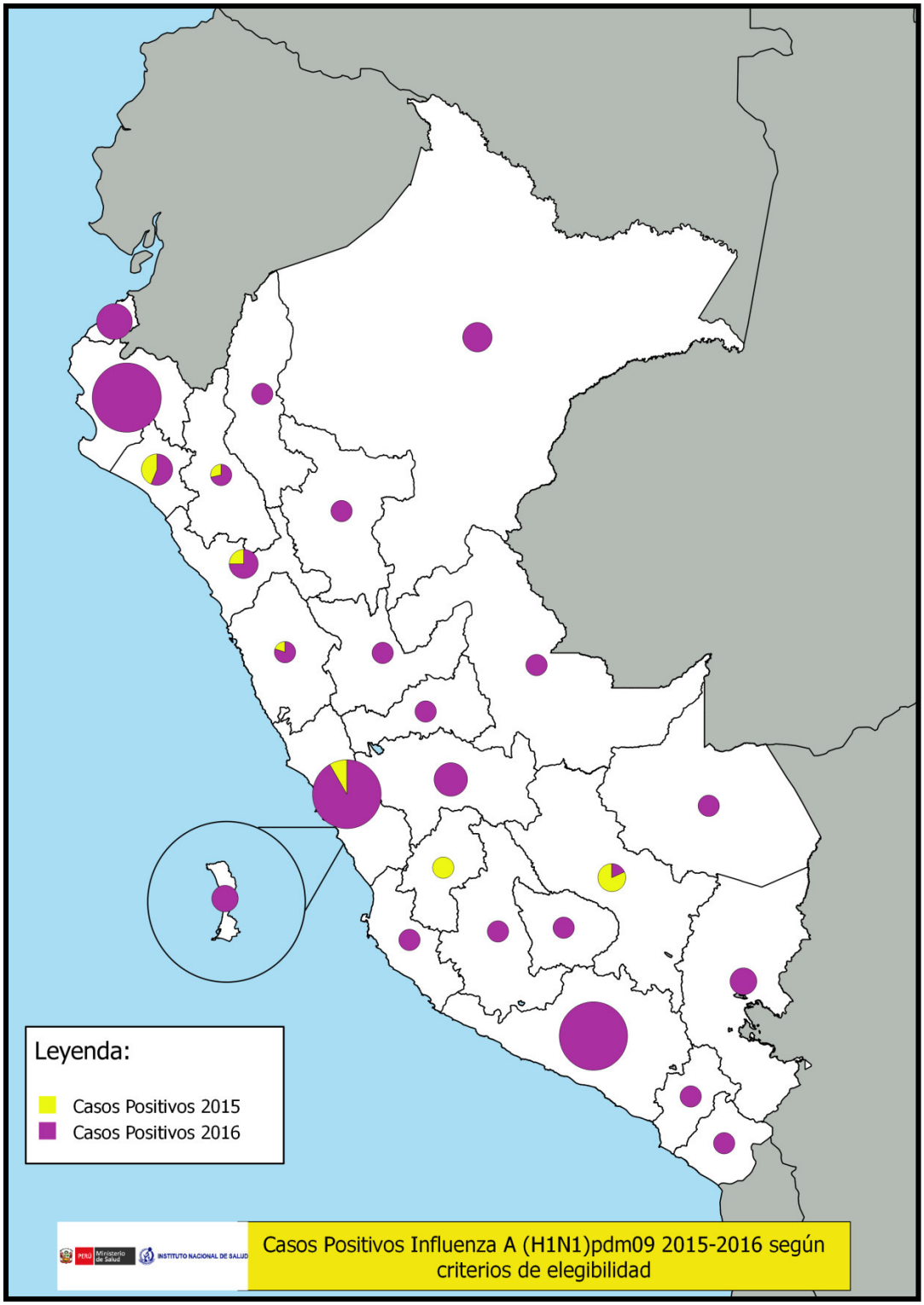


Figura 1. Distribución de Casos Positivos de Influenza A(H1N1)pdm09 2015-2016 según criterios de elegibilidad. Fuente: LRNVR-INS

El análisis de High Resolution Melting es un proceso cerrado de un solo paso, que incorpora el proceso de PCR en tiempo real; de esta manera se amplificó de forma exitosa el gen de la Hemaglutinina y de la Matriz. La amplificación de las muestras seleccionadas para el gen Hemaglutinina presento un Ct entre 18 a 28 ciclos y para el gen de la Matriz los Ct fueron entre 20 y 32 ciclos. (Figura 2 y 3)

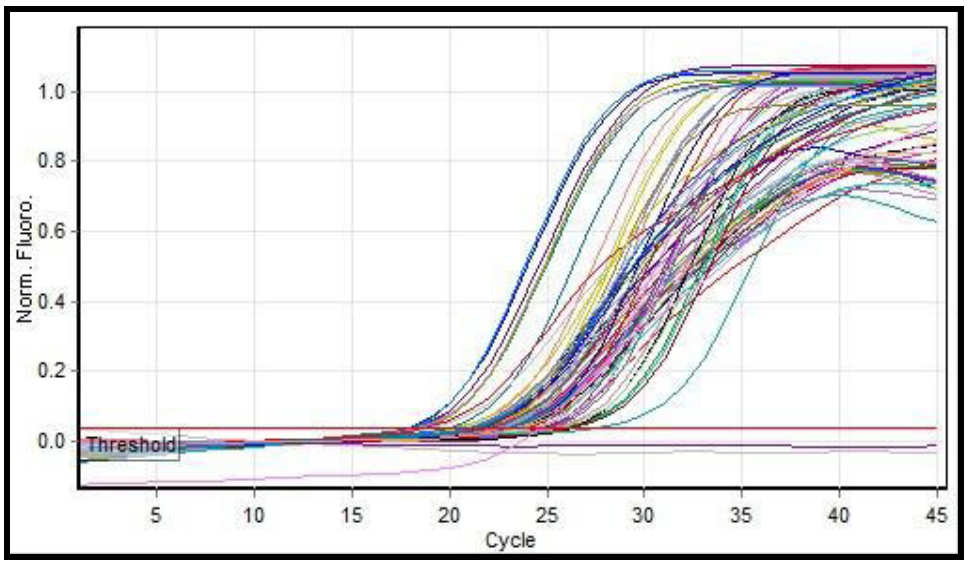


Figura 2. Curva de amplificación del gen Hemaglutinina

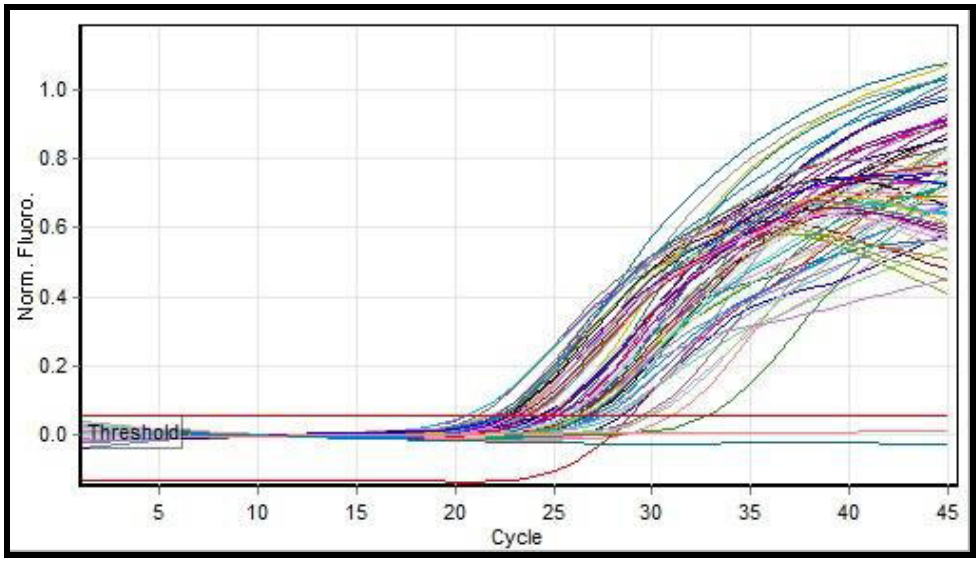


Figura 3. Curva de amplificación del gen de la Matriz

El análisis de HRM para las muestras analizadas durante 2015 - 2016 mostró perfiles diferentes en base a los genes de Hemaglutinina y de la Matriz. Usando el Software 2.3.1 de RotorGene para el análisis de HRM se pudo agrupar los diferentes perfiles según la curva normalizada de HRM; de acuerdo a la forma de la curva se agruparon en 4 genotipos diferentes para el gen HA designados como A, B, C y D (Tabla 4 y Figura 4); y 3 genotipos para el gen M designados como a, b y c (Tabla 5 y Figura 5)

Tabla 4. Genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 del Perú, mediante HRM para el gen de hemaglutinina.

No.	Color	Código	Genotipo HA	Confianza %
1		7983-28	A	100.00
2		7779-205	C	100.00
3		99-16	B	100.00
4		234-16	D	100.00

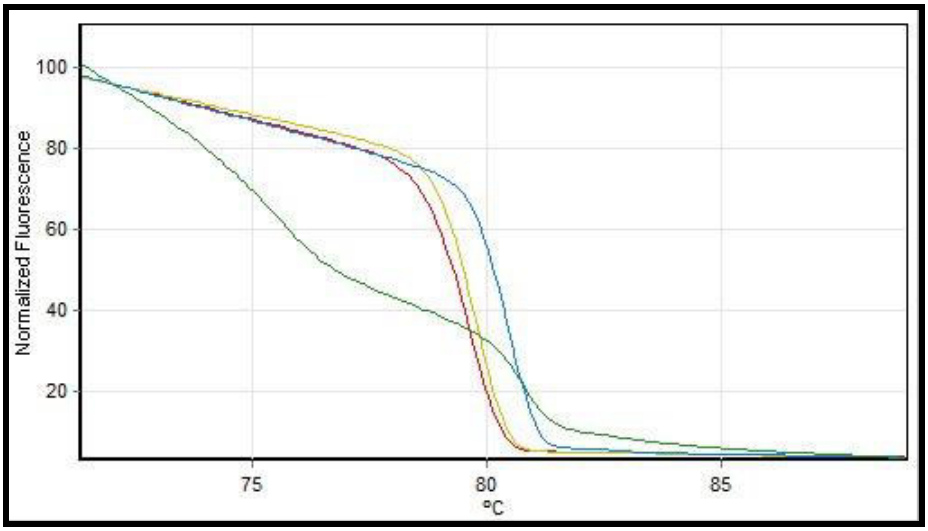


Figura 4. Curva de High Resolution Melting normalizada de los genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 para el gen de hemaglutinina.

Tabla 5. Genotipos frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 del Perú mediante HRM para el gen de la matriz.

No.	Color	Código	Genotipo M	Confianza %
38		7779-10	c	100.00
42		10-15	a	100.00
43		16-16	b	100.00

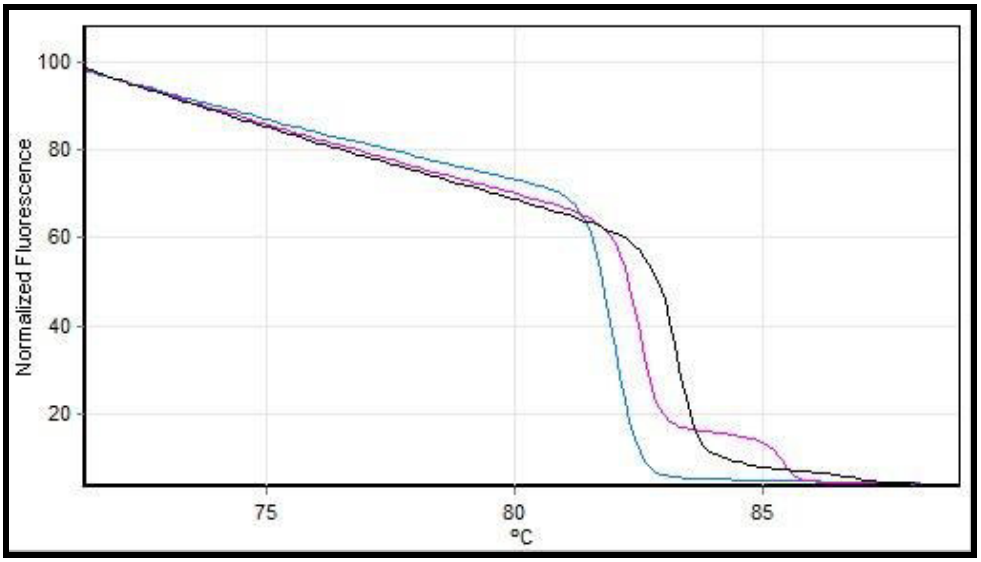


Figura 5. Curva de High Resolution Melting normalizada de los genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 para el gen de la matriz.

Los genotipos identificados en base a los perfiles de las curvas se encuentran distribuidos en base a sus frecuencias relativas. Según el gen HA estos genotipos se distribuyen en un 65,85% (189) para el genotipo A, 11,50% (33) genotipo B, 5,23% (15) genotipo C, 17,42% (50) genotipo D (Figura 6). Para el gen M los genotipos se distribuyen en 63,76% (183) genotipo a, 34,84% (100) genotipo b y 1,39% (4) genotipo c (Figura 7). En ambos casos el genotipo de mayor frecuencia es el A que supera el 60% del total, y el de menor frecuencia es el genotipo C que va hasta el 5% del total.

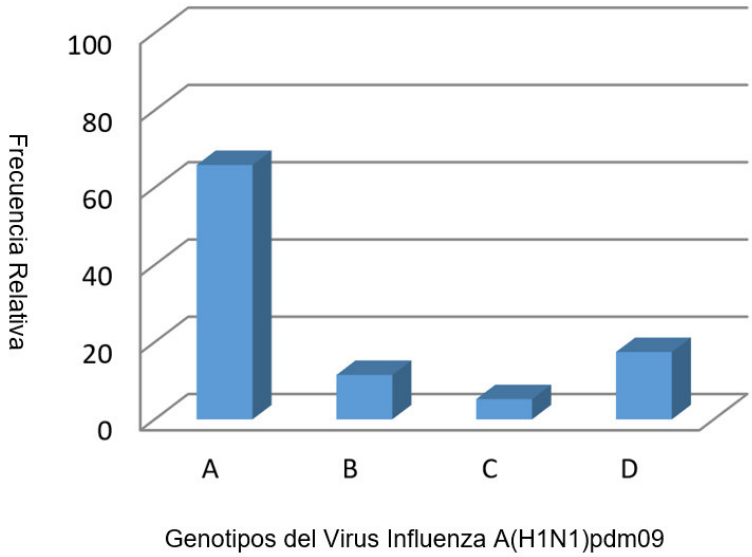


Figura 6. Frecuencia relativa de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015-2016, por HRM para el gen de hemaglutinina.

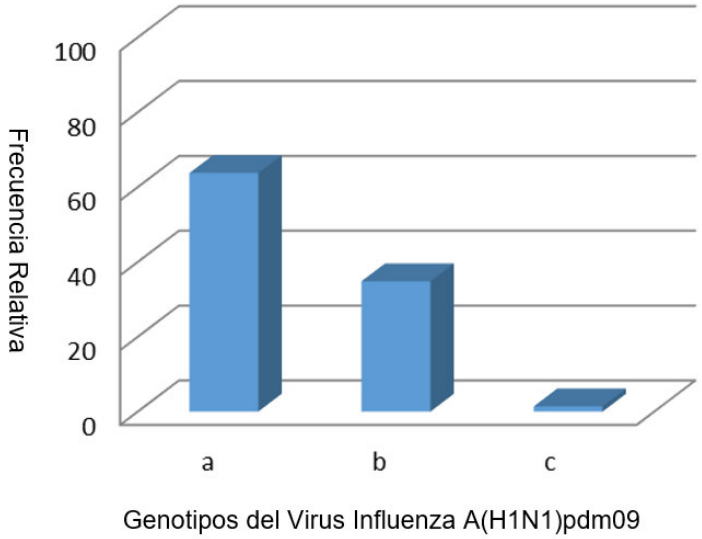


Figura 7. Frecuencia relativa de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015-2016, por HRM para el gen de la Matriz.

Los 4 perfiles del gen HA y 3 perfiles del gen M se combinaron, dando como resultado 10 genotipos para influenza A(H1N1)pdm09 en las muestras peruanas analizadas durante los años 2015 – 2016 (Anexo 1: Tabla 20 y 21).

Los genotipos analizados están representados del I-X para un total de 287 muestras los cuales se encuentran distribuidos según frecuencias; el genotipo I tiene 35,89% (103), II es 29,27% (84), III es 0,7% (2), IV es 10,45% (30), V es 1,05% (3), VI es 2,79% (8), VII es 2,44% (7), VIII es 14,63% (42), IX es 2,09% (6), X es 0,70% (2) (Figura 8). Los genotipos más frecuentes son el I, II, IV, VIII, entre ellos representan el 90,24% del total de muestras.

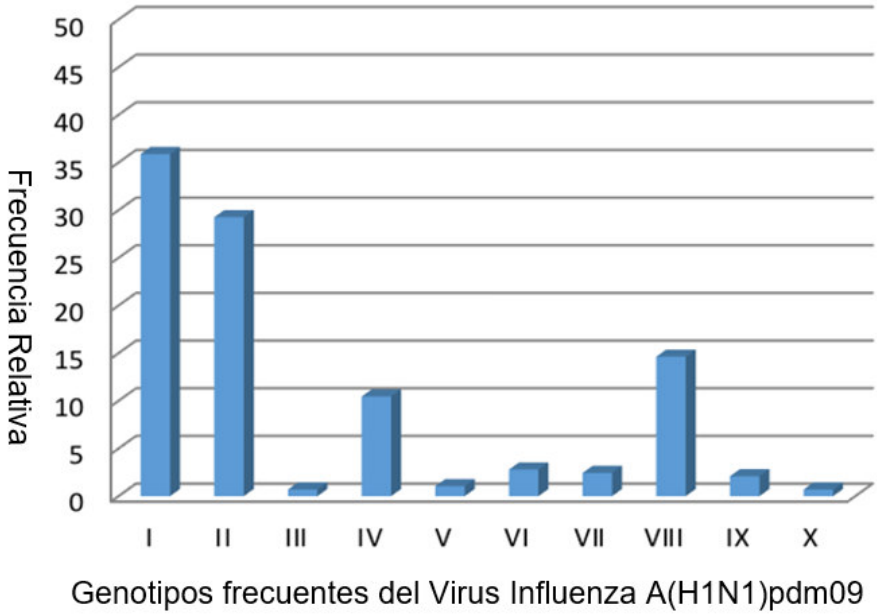


Figura 8. Frecuencia relativa de genotipos más frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015-2016, por HRM combinando los genes M y HA.

Los genotipos identificados se encuentran distribuidos en todo el país en diferentes frecuencias de acuerdo al número de casos analizados según criterios de inclusión. Los departamentos con un mayor número de casos presentan una distribución mayor de los genotipos. En Arequipa se detectó los 10 genotipos, asimismo en Lima se detectó 7 genotipos y en Piura 8 genotipos. (Figura 9 y Anexo 2: Tabla 22).

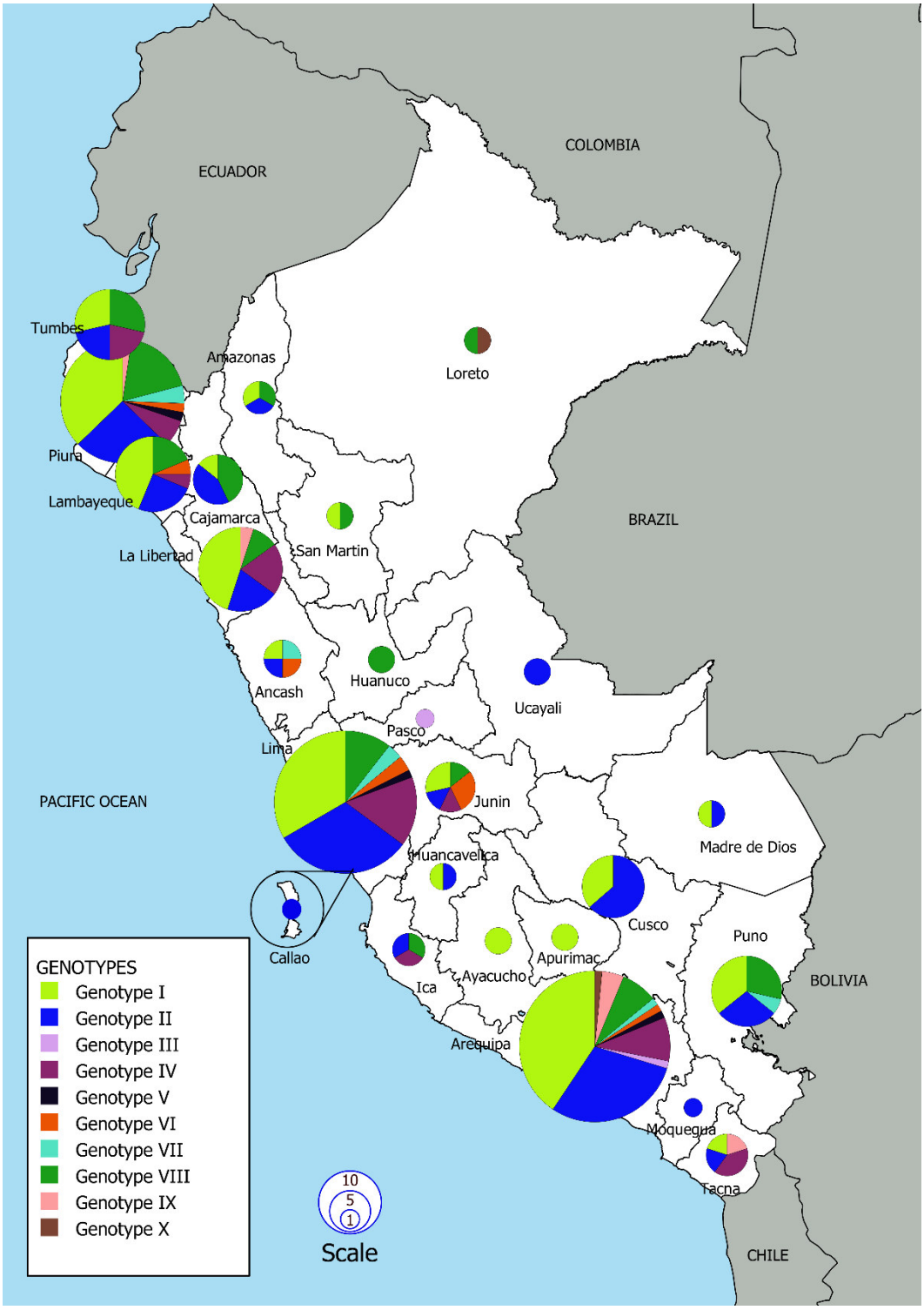


Figura 9. Distribución de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 según departamento durante los años 2015-2016.

Los genotipos encontrados se asociaron al grupo etario mediante frecuencia acumulada de los genotipos (I-X).

En la Figura 10, se puede observar la distribución de los genotipos según grupo etario. Se observa que el genotipo I es el de mayor frecuencia y se encuentra en todos los grupos etarios menos en pacientes de 12-18años. El genotipo II se encuentra en todos los genotipos observandose una ligera tendencia de declive cuando mas jóven es el paciente,el genotipo IV y VIII se encuentran distribuidos en todos los grupos etarios. La distribución de los genotipos en base al grupo etario de 12-18 años es ligeramente diferente al resto del grupo etario; no obstante, este grupo presenta menos muestras (Anexo 2: Tabla 23).

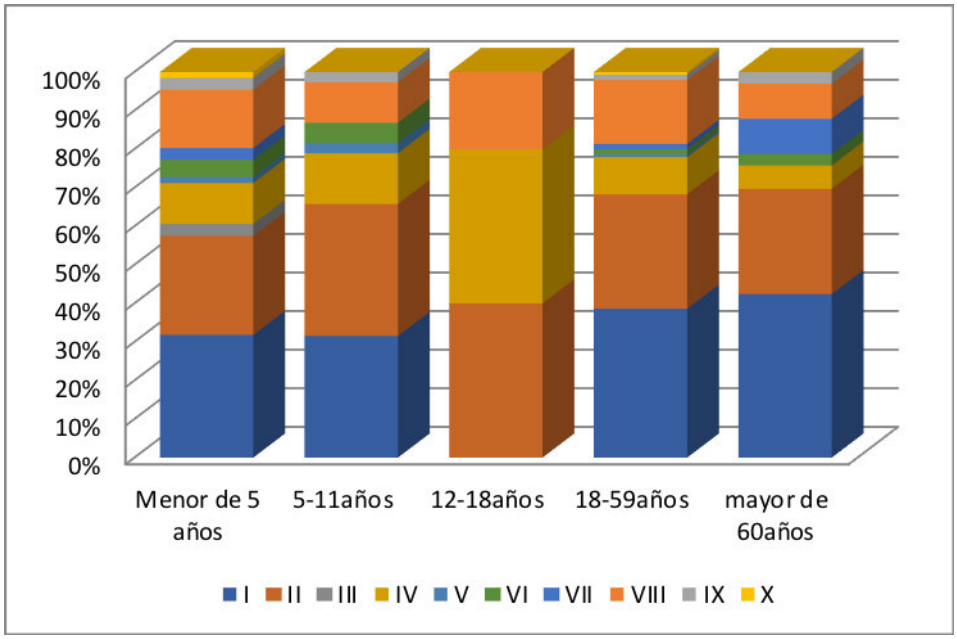


Figura 10. Frecuencia acumulada de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 según grupo etario durante los años 2015-2016.

En la Figura 11, se puede observar la distribución de los genotipos según sexo. Se observa que el genotipo I es el de mayor frecuencia y se encuentra en ambos grupos con diferencia ligera, el genotipo II se encuentra en una ligera mayor frecuencia en el grupo femenino que el masculino, el genotipo IV y VIII se encuentra en una ligera mayor frecuencia en el sexo masculino que el femenino,el resto de genotipos no se observa mayor diferencia. (Anexo 2: Tabla 24).

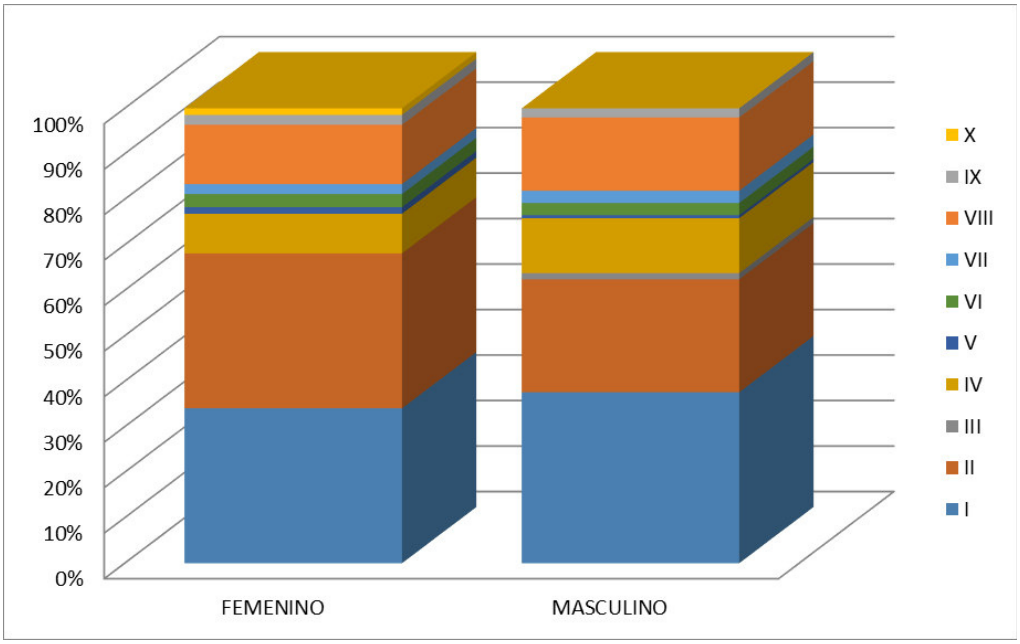


Figura 11. Frecuencia acumulada de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 según sexo durante los años 2015-2016.

En la Figura 12 se puede observar la distribución de los genotipos según su clasificación clínica. Se observa en los casos ETI el genotipo I y II tienen una mayor frecuencia seguido del IV y VIII además de observar la ausencia del genotipo VII que si se encuentra en los casos IRAG e IRAG inusitado. Los casos IRAG también presentan una mayor frecuencia del genotipo I y II seguido del genotipo VIII y IV. Para los casos IRAG inusitado se encuentran una mayor frecuencia del genotipo VIII a diferencia de los otros casos clínicos seguido del genotipo I, II y IV. El genotipo III solo se encuentra en los casos ETI. El genotipo V se encontró en los casos ETI e IRAG. El genotipo VI se encontró en los casos ETI e IRAG inusitado. El genotipo IX tiene una ligera mayor frecuencia en los casos IRAG e IRAG inusitado a diferencia de los casos ETI. El genotipo X se encontró en los casos ETI e IRAG inusitado. (Anexo 2: Tabla 25).

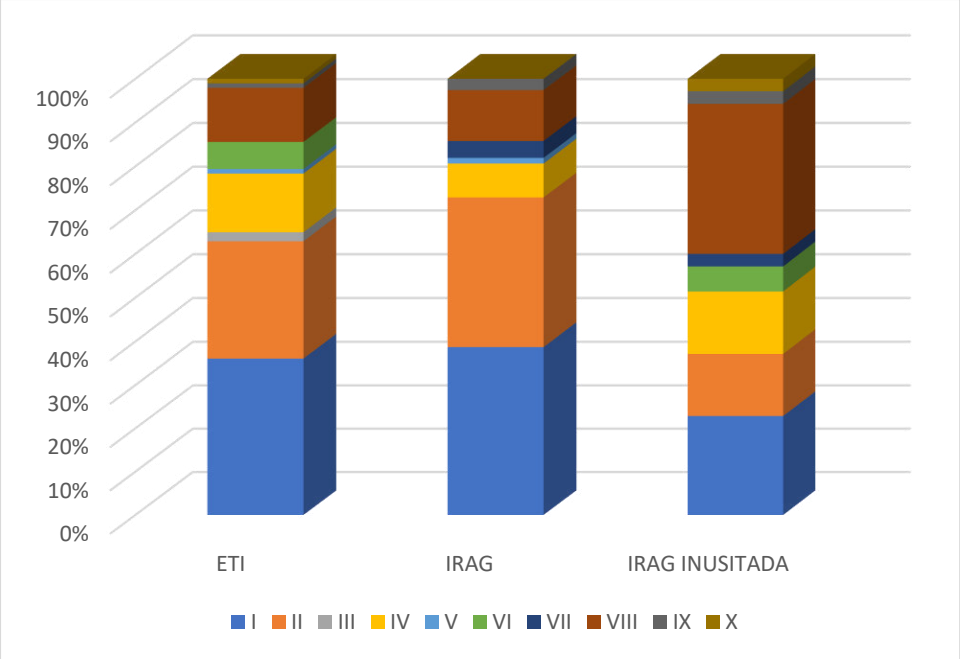


Figura 12. Frecuencia acumulada de genotipos del virus influenza A(H1N1)pdm09 según clasificación clínica durante los años 2015-2016.

Se evalúo la asociación entre el grupo etario y la clínica de las muestras analizadas obteniendo: menores de 5 años asociada a la clínica IRAG (p = 0,0002), los casos entre 5 -11 años asociado a la clínica ETI (p = 0,0117), los casos entre 12 -18 años no se encontró asociación con la clasificación clínica (p = 0,6547), los casos entre 18 -60 años se encontró asociada a la clínica IRAG (p = 0,0001) y mayores de 60 años se encontró asociación con la clínica IRAG (p = 0,0013).

Para ver la asociación de los 10 genotipos frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 en forma global con el grupo etario, sexo y clínica de las muestras analizadas se aplicó tablas de contingencia. Los resultados obtenidos indican que no existe asociación entre los grupos etarios y los genotipos (p = 0,6807), de igual manera no existe asociación con el sexo y genotipos (p = 0,5240); sin embargo, encontramos asociación significativa entre la clínica y los genotipos (p = 0,0015). A pesar de no existir significancia estadística entre el grupo etario y los genotipos de forma global se realizó el análisis por particiones con los genotipos obteniendo para el grupo etario de 18 – 60 años una asociación significativa con los genotipos I (p = 0,0001), II (p =

0,0001), IV (p = 0,0026) y VIII (p = 0,0001); para los restantes genotipos no se encontró asociación con ningún grupo etario. La asociación entre los genotipos y la clasificación clínica también se evaluó por particiones obteniendo una asociación entre la clínica IRAG el genotipo I (p = 0,0001), el genotipo II (p = 0,0005) y el genotipo VIII (p = 0,0055), para los demás genotipos con respecto a la clasificación clínica no se encontró asociación significativa.

5.2. Secuenciación del genoma completo del virus Influenza A(H1N1)pdm09

5.2.1. Amplificación por M-RTPCR del genoma completo del Virus Influenza A(H1N1)pdm09 en 10 genotipos

Se hizo la amplificación de los 10 genotipos mas frecuentes por duplicado utilizando los primers que amplifican el genoma completo de Zhou *et al.* (2009). Los productos obtenidos se purificaron y mezclaron para la obtención de todo el genoma completo que fueron visualizados en un gel de agarosa, obteniendose diferentes tamaños correspondientes a cada segmento de los genes que conforman el genoma completo (Figura 13).

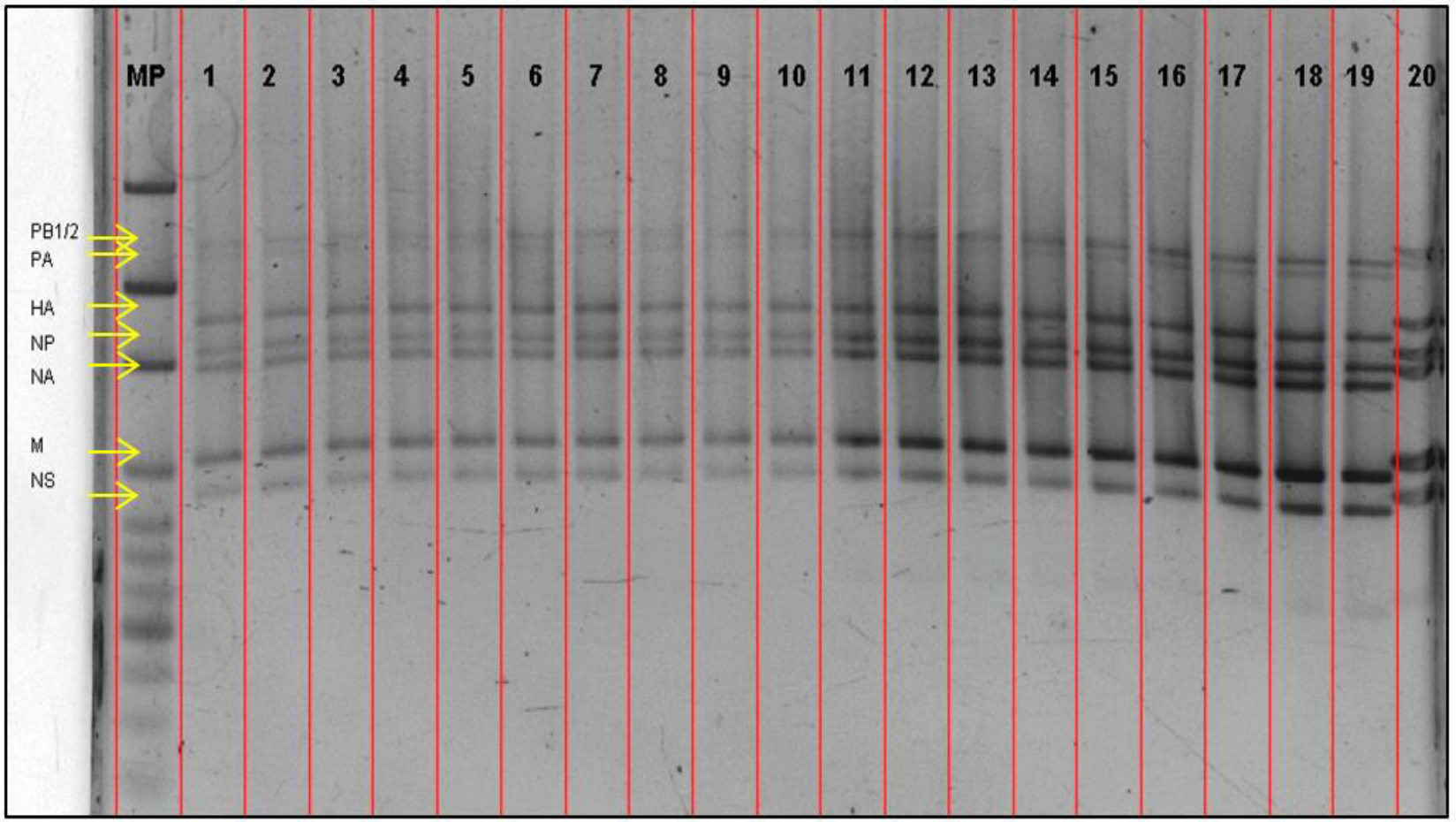


Figura 13. Amplificación por M-RTPCR del genoma completo del virus influenza A (H1N1)pdm09 durante los años 2015-2016. Electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Carril MP: Marcador de peso molecular. Carril 1 y 2: Genotipo I. Carril 3 y 4: Genotipo II. Carril 5 y 6: Genotipo III. Carril 7 y 8: Genotipo IV. Carril 9 y 10: Genotipo V. Carril 11 y 12: Genotipo VI. Carril 13 y 14: Genotipo VII. Carril 15 y 16: Genotipo VIII. Carril 17 y 18: Genotipo IX. Carril 19 y 20: Genotipo X.

5.2.2. Análisis bioinformático del genoma completo de los genotipos mas frecuentes del Virus Influenza A(H1N1)pdm09

a. Análisis de la calidad de los archivos fastq obtenidos

El análisis de FastQC, fue realizado para visualizar de forma gráfica la calidad de los datos obtenidos de la secuenciación por NGS, el proceso fue realizado para los 10 genotipos analizados; adicionalmente se realizó un nuevo análisis de FastQC después de la limpieza y filtrado de calidad, con la finalidad de observar los datos y continuar con los análisis.

Las figuras 14 y 15, es un gráfico box-plot donde se muestra la calidad de las secuencias por posición tanto de las secuencias obtenidas en la dirección forward (R1) como de la secuencias obtenidas en la dirección reverse (R2). Se ha programado secuenciar 251 posiciones en cada dirección. De las figuras se observa que la calidad de los reads disminuye en los extremos.

Las Figuras 16 y 17, representan los valores de calidad de las secuencias luego de la limpieza o procesamiento de las fastq. Luego de la limpieza de los fastq se observa que la calidad de los reads mejora ubicandose en la region de Q30 (zona verde claro).

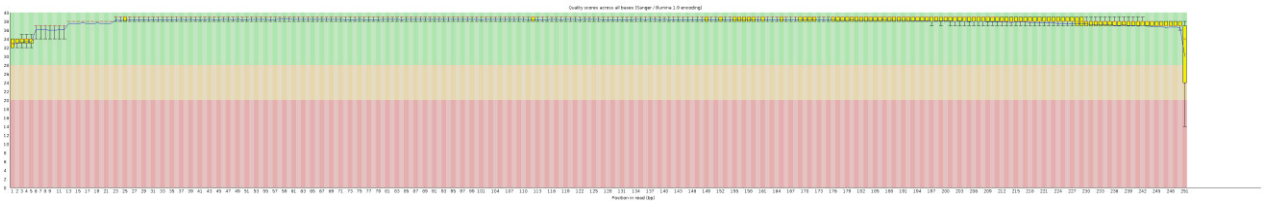


Figura 14. Calidad de secuencia por base del R1_001.fastq sin procesar del aislado A/Puno/INS6_006/2016

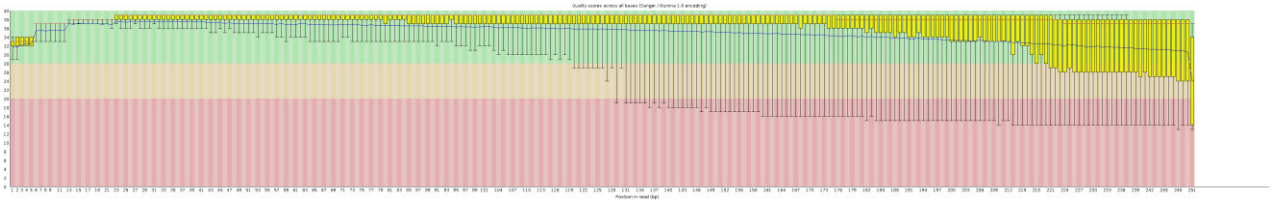


Figura 15. Calidad de secuencia por base del R2_001.fastq sin procesar del aislado A/Puno/INS6_006/2016

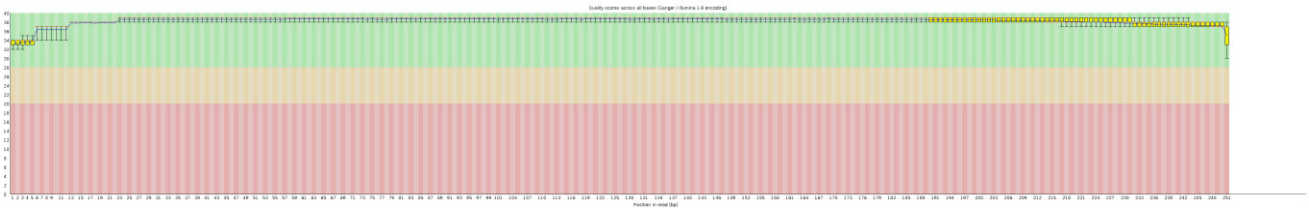


Figura 16. Calidad de secuencia por base de los reads en el archivos fastq forward (R1_001.fastq) procesado con Sickle del aislado A/Puno/INS6_006/2016

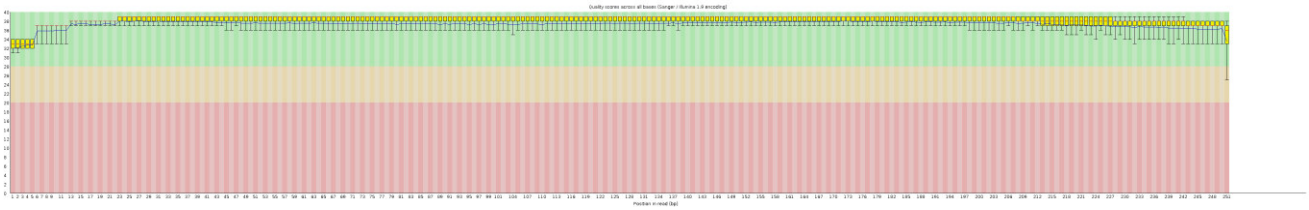


Figura 17. Calidad de secuencia por base de los reads en el archivos fastq reverse (R2_001.fastq) procesado con Sickle del aislado A/Puno/INS6_006/2016

En la Tabla 6 se indican los resultados obtenidos para cada muestra secuenciada como número de reads, tamaño de los fragmentos promedio y su desviación estandar. Los datos indican que se obtuvieron mas de 174 mil reads, asimismo luego del procesamiento o limpieza de los reads obtenidos el porcentaje de los read con calidad fue mayor a 95,5%.

Tabla 6. Estadística de los reads obtenidos

Aislados peruanos	Parámetros	Número de reads R1	Promedio de longitud de reads R1	Desviación estándar de la longitud de read R1	Número de reads R2	Promedio de longitud de reads R2	Desviación estándar de la longitud de read R2	TOTAL DE READS
A/Ancash/INS4_421/2016	Original	232,182	234.8	50.8	232,182	234.8	50.8	464,364
	Procesado	226,435	233.8	52.2	226,435	233.1	53.6	452,870
	Diferencia	-5,747.00	-1	1.4	-5,747.00	-1.7	2.8	-11,494.00
	% Permanencia	97.5	--	--	97.5	--	--	97.5
A/Arequipa/INS5_081/2016	Original	375,679	233.8	51.4	375,679	233.8	51.4	751,358
	Procesado	368,038	232.8	53	368,038	232.6	53.4	736,076
	Diferencia	-7,641.00	-1	1.6	-7,641.00	-1.2	2	-15,282.00
	% Permanencia	98	--	--	98	--	--	98
A/Arequipa/INS5_881/2016	Original	268,423	231.4	53.8	268,423	231.4	53.8	536,846
	Procesado	262,650	230.3	55.4	262,650	230.2	55.6	525,300
	Diferencia	-5,773.00	-1.1	1.6	-5,773.00	-1.2	1.8	-11,546.00
	% Permanencia	97.8	--	--	97.8	--	--	97.8
A/Arequipa/INS6_868/2016	Original	320,948	234.4	50.2	320,948	234.5	50.2	641,896
	Procesado	314,684	233.5	51.8	314,684	233.3	52.2	629,368
	Diferencia	-6,264.00	-0.9	1.6	-6,264.00	-1.2	2	-12,528.00
	% Permanencia	98	--	--	98	--	--	98
A/Cusco/INS5_825/2015	Original	353,664	234.3	50.8	353,664	234.3	50.8	707,328
	Procesado	346,444	233.4	52.2	346,444	233.1	52.8	692,888
	Diferencia	-7,220.00	-0.9	1.4	-7,220.00	-1.2	2	-14,440.00
	% Permanencia	98	--	--	98	--	--	98
A/La_Libertad/INS5_380/2015	Original	250,238	234.1	52	250,238	234.1	52	500,476
	Procesado	243,816	232.8	53.8	243,816	232.3	54.8	487,632
	Diferencia	-6,422.00	-1.3	1.8	-6,422.00	-1.8	2.8	-12,844.00
	% Permanencia	97.4	--	--	97.4	--	--	97.4
A/Lambayeque/INS5_514/2015	Original	233,595	231.8	55.6	233,595	231.8	55.6	467,190
	Procesado	228,198	230.6	56.8	228,198	230.5	57	456,396
	Diferencia	-5,397.00	-1.2	1.2	-5,397.00	-1.3	1.4	-10,794.00
	% Permanencia	97.7	--	--	97.7	--	--	97.7
A/Lambayeque/INS5_790/2015	Original	270,452	232.5	54.8	270,452	232.5	54.8	540,904
	Procesado	264,066	231.8	55.4	264,066	231.4	56.2	528,132
	Diferencia	-6,386.00	-0.7	0.6	-6,386.00	-1.1	1.4	-12,772.00
	% Permanencia	97.6	--	--	97.6	--	--	97.6
A/Lima/INS3_701/2016	Original	186,132	234.8	50	186,132	234.8	50	372,264
	Procesado	182,065	234	51.2	182,065	233.4	52.4	364,130
	Diferencia	-4,067.00	-0.8	1.2	-4,067.00	-1.4	2.4	-8,134.00
	% Permanencia	97.8	--	--	97.8	--	--	97.8
A/Lima/INS4_403/2016	Original	186,261	232.2	56.4	186,261	232.2	56.4	372,522

	Procesado	181,320	231	57.6	181,320	230.4	58.2	362,640
	Diferencia	-4,941.00	-1.2	1.2	-4,941.00	-1.8	1.8	-9,882.00
	% Permanencia	97.3	--	--	97.3	--	--	97.3
A/Lima/LIMAM16_372/2016	**Original**	242,074	235.1	50.2	242,074	235.1	50.2	484,148
	Procesado	236,527	234	51.8	236,527	233.6	52.6	473,054
	Diferencia	-5,547.00	-1.1	1.6	-5,547.00	-1.5	2.4	-11,094.00
	% Permanencia	97.7	--	--	97.7	--	--	97.7
A/Loreto/INS5_168/2016	**Original**	232,415	234.9	50.8	232,415	234.9	50.8	464,830
	Procesado	226,732	233.8	52.4	226,732	233.4	53.4	453,464
	Diferencia	-5,683.00	-1.1	1.6	-5,683.00	-1.5	2.6	-11,366.00
	% Permanencia	97.6	--	--	97.6	--	--	97.6
A/Pasco/INS6_335/2016	**Original**	346,346	234.5	50.2	346,346	234.5	50.2	692,692
	Procesado	339,568	233.1	52.6	339,568	233.3	52.2	679,136
	Diferencia	-6,778.00	-1.4	2.4	-6,778.00	-1.2	2	-13,556.00
	% Permanencia	98	--	--	98	--	--	98
A/Piura/INS4_288/2016	**Original**	372,453	235.6	48.2	372,453	235.6	48	744,906
	Procesado	363,360	234.6	50	363,360	233.9	51.6	726,720
	Diferencia	-9,093.00	-1	1.8	-9,093.00	-1.7	3.6	-18,186.00
	% Permanencia	97.6	--	--	97.6	--	--	97.6
A/Piura/INS4_294/2016	**Original**	115,334	231.6	57.6	115,334	231.6	57.6	230,668
	Procesado	111,765	230.3	58.6	111,765	229.7	59.4	223,530
	Diferencia	-3,569.00	-1.3	1	-3,569.00	-1.9	1.8	-7,138.00
	% Permanencia	96.9	--	--	96.9	--	--	96.9
A/Piura/INS4_888/2016	**Original**	232,817	229.6	56	232,817	229.7	56	465,634
	Procesado	222,484	227.8	58.2	222,484	227	59.6	444,968
	Diferencia	-10,333.00	-1.8	2.2	-10,333.00	-2.7	3.6	-20,666.00
	% Permanencia	95.6	--	--	95.6	--	--	95.6
A/Puno/INS6_006/2016	**Original**	89,841	228.8	65.4	89,841	228.8	65.4	179,682
	Procesado	87,116	228.3	64.4	87,116	228.4	64	174,232
	Diferencia	-2,725.00	-0.5	-1	-2,725.00	-0.4	-1.4	-5,450.00
	% Permanencia	97	--	--	97	--	--	97
A/Tumbes/INS4_860/2016	**Original**	282,562	235.4	49.2	282,562	235.4	49.2	565,124
	Procesado	276,502	234.4	51	276,502	234	52	553,004
	Diferencia	-6,060.00	-1	1.8	-6,060.00	-1.4	2.8	-12,120.00
	% Permanencia	97.9	--	--	97.9	--	--	97.9
A/Arequipa/INS6_950/2016	**Original**	350,489	233.7	51.8	350,489	233.7	51.8	700,978
	Procesado	343,128	232.7	53.2	343,128	232.5	53.6	686,256
	Diferencia	-7,361.00	-1	1.4	-7,361.00	-1.2	1.8	-14,722.00
	% Permanencia	97.9	--	--	97.9	--	--	97.9
A/Arequipa/INS8_499/2016	**Original**	182,670	234.8	51.2	182,670	234.8	51.2	365,340
	Procesado	178,819	233.9	52.4	178,819	233.6	52.8	357,638
	Diferencia	-3,851.00	-0.9	1.2	-3,851.00	-1.2	1.6	-7,702.00
	% Permanencia	97.9	--	--	97.9	--	--	97.9

b. Análisis del ensamblado por SPAdes

El ensamble se realizó con el programa SPAdes, los datos estadisticos del ensamblado fueron obtenidos por el programa Quast para los 20 genomas por segmento con respecto al genoma de referencia (Tabla 7 y Anexo 3: Tabla 26-45).

Tabla 7. Resultados del ensamblado de los aisaldos peruanos

Aislado	Segmento	# contigs (>= 0 bp)	# contigs (>= 1000 bp)	Reference length	Genome fraction (%)	Largest alignment	Total aligned length	NGA50	NGA75	LGA50	LGA75	N50	Covertura promedio
A/Ancash/INS4_421/2016	**PB1**	113	17	2274	100	2274	5489	2274	2274	1	1	2024	1568.3
	PB2	113	17	2280	100	2280	3447	2280	2280	1	1	2024	497.8
	PA	113	17	2151	99.775	2151	4711	2151	2151	1	1	2024	1605.4
	NS	113	17	863	100	863	1758	863	863	1	1	2024	7469.9
	NP	113	17	1497	99.936	1497	1554	1497	1497	1	1	2024	1695.2
	NA	113	17	1410	99.313	1410	10115	1410	1410	1	1	2024	1216.7
	M	113	17	982	100	982	6096	982	982	1	1	2024	7524.6
	HA	113	17	1701	100	1701	1751	1701	1701	1	1	2024	3742.7
A/Arequipa/INS5_081/2016	**PB1**	253	10	2274	99.701	2274	2274	2274	2274	1	1	1602	2824.7
	PB2	253	10	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	1602	2169.1
	PA	253	10	2151	100	2151	2151	2151	2151	1	1	1602	3528
	NS	253	10	863	99.086	863	863	863	863	1	1	1602	7675.4
	NP	253	10	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	1602	5208.1
	NA	253	10	1410	98.586	1410	1410	1410	1410	1	1	1602	2531.5
	M	253	10	982	100	982	982	982	982	1	1	1602	7596.7
	HA	253	10	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	1602	6725.1
A/Arequipa/INS5_881/2016	**PB1**	215	11	2274	100	2274	2274	2274	2274	1	1	1303	1561.3
	PB2	215	11	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	1303	1821.3
	PA	215	11	2151	99.955	2151	2151	2151	2151	1	1	1303	2352.7
	NS	215	11	863	100	863	863	863	863	1	1	1303	7466.9
	NP	215	11	1497	97.751	1497	1497	1497	1497	1	1	1303	1359.1
	NA	215	11	1410	100	1410	1410	1410	1410	1	1	1303	497.3
	M	215	11	982	100	982	982	982	982	1	1	1303	7237.7
	HA	215	11	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	1303	2371.2
A/Arequipa/INS6_868/2016	**PB1**	253	10	2274	99.701	2274	2274	2274	2274	1	1	1602	1408.6
	PB2	253	10	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	1602	1038.6
	PA	253	10	2151	90.086	2151	2151	2151	2151	1	1	1602	3623.6
	NS	253	10	863	100	863	863	863	863	1	1	1602	7727.8
	NP	253	10	1497	98.586	1497	1497	1497	1497	1	1	1602	2855
	NA	253	10	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	1602	1098.7

	M	253	10	982	100	982	982	982	982	1	1	1602	7692.5
	HA	253	10	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	1602	6034.8
A/Cusco/INS5_825/2015	**PB1**	164	13	2274	100	2274	4115	2274	2274	1	1	2652	3371.9
	PB2	164	13	2280	100	2280	2333	2280	2280	1	1	2652	2684.7
	PA	164	13	2151	99.955	2151	4547	2151	2151	1	1	2652	4817.4
	NS	164	13	863	100	863	5360	863	863	1	1	2652	7705.7
	NP	164	13	1497	97.751	1497	1520	1497	1497	1	1	2652	3369.1
	NA	164	13	1410	100	1410	1455	1410	1410	1	1	2652	2368.9
	M	164	13	982	100	982	5080	982	982	1	1	2652	7652.1
	HA	164	13	1701	100	1701	10506	1701	1701	1	1	2652	7033.7
A/La_Libertad/INS5_380/2015	**PB1**	202	9	2274	98.547	2274	2274	2274	2274	1	1	1609	539.5
	PB2	202	9	2280	99.213	2280	2280	2280	2280	1	1	1609	460.5
	PA	202	9	2151	100	2151	2151	2151	2151	1	2	1609	259.1
	NS	202	9	863	100	863	863	863	863	1	1	1609	7418.9
	NP	202	9	1497	99.614	1497	1497	1497	1497	1	1	1609	1626.2
	NA	202	9	1410	99.725	1410	1410	1410	1410	1	1	1609	1137.8
	M	202	9	982	100	982	982	982	982	1	1	1609	7305.1
	HA	202	9	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	1609	2559.1
A/Lambayeque/INS5_514/2015	**PB1**	377	17	2280	99.802	2274	2274	2274	2274	1	1	974	1280
	PB2	377	17	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	974	1271.4
	PA	377	17	2151	99.955	2151	2151	2151	2151	1	1	974	1768.9
	NS	377	17	863	100	863	863	863	863	1	1	974	5694.5
	NP	377	17	1497	99.614	1497	1497	1497	1497	1	1	974	1148
	NA	377	17	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	974	461
	M	377	17	982	100	982	982	982	982	1	1	974	6493.6
	HA	377	17	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	974	1632
A/Lima/INS4_403/2016	**PB1**	109	8	2274	99.744	2274	3081	2274	2274	1	1	2304	351.4
	PB2	109	8	2280	100	2280	3319	2280	2280	1	1	2304	219.6
	PA	109	8	2151	99.955	2151	2910	2151	2151	1	1	2304	315.9
	NS	109	8	863	99.659	863	863	863	863	1	1	2304	201.1
	NP	109	8	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	2304	229.7
	NA	109	8	1410	99.656	1410	1450	1410	1410	1	1	2304	201
	M	109	8	982	100	982	1016	982	982	1	1	2304	1051
	HA	109	8	1701	100	1701	1751	1701	1701	1	1	2304	1741.7
A/Lambayeque/INS5_790/2015	**PB1**	1016	13	2274	99.111	2274	2274	2274	2274	1	1	862	2444.9
	PB2	1016	13	2280	99.786	2280	2280	2280	2280	1	1	862	1895.2
	PA	1016	13	2151	99.955	2151	2151	2151	2151	1	1	862	3797.5
	NS	1016	13	863	68.373	758	1193	678	325	1	2	862	224.3
	NP	1016	13	1497	99.614	1497	1497	1497	1497	1	1	862	3892.1
	NA	1016	13	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	862	2681.3
	M	1016	13	982	100	982	982	982	982	1	1	862	7667.1
	HA	1016	13	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	862	6162
A/Lima/INS3_701/2016	**PB1**	156	8	2274	100	2274	2274	2274	2274	1	1	1650	1665.5
	PB2	156	8	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	1650	1235.9
	PA	156	8	2151	92.88	2151	2151	2151	2151	1	1	1650	2977.3
	NS	156	8	863	100	863	863	863	863	1	1	1650	7472.1
	NP	156	8	1497	99.614	1497	1497	1497	1497	1	1	1650	1574.9
	NA	156	8	1410	98.969	1410	1410	1410	1410	1	1	1650	1084.2
	M	156	8	982	100	982	982	982	982	1	1	1650	7044.5

	HA	156	8	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	1650	3675.2
A/Lima/LIMAM16_372/2016	**PB1**	318	8	2274	100	2274	2274	2274	2274	1	1	1302	531.6
	PB2	318	8	2280	96.614	2280	2280	2280	2280	1	1	1302	527.3
	PA	318	8	2151	99.167	2151	2151	2151	2151	1	1	1302	1604.3
	NS	318	8	863	100	863	863	863	863	1	1	1302	7552.1
	NP	318	8	1497	70.064	1246	1845	1125	875	1	2	1302	280.6
	NA	318	8	1410	99.45	1410	1410	1410	1410	1	1	1302	2043.7
	M	318	8	982	99.409	982	982	982	982	1	1	1302	7607.7
	HA	318	8	1701	99.486	1701	1701	1701	1701	1	1	1302	3830.3
A/Loreto/INS5_168/2016	**PB1**	997	32	2274	100	2274	2274	2274	2274	1	1	880	2157.8
	PB2	997	32	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	880	1335.2
	PA	997	32	2151	100	2151	2151	2151	2151	1	1	880	2463.5
	NS	997	32	863	100	863	863	863	863	1	1	880	7292.1
	NP	997	32	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	880	3026.5
	NA	997	32	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	880	2441.8
	M	997	32	982	97.343	982	982	982	982	1	1	880	7543.1
	HA	997	32	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	880	5367.8
A/Pasco/INS6_335/2016	**PB1**	1104	35	2274	68.547	1193	2490	1193	895	1	2	989	273.3
	PB2	1104	35	2280	70.544	1195	2490	1180	932	1	2	989	239.4
	PA	1104	35	2151	100	2151	2151	2151	2151	1	1	989	3390.6
	NS	1104	35	863	100	863	863	863	863	1	1	989	7672.1
	NP	1104	35	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	989	5184.6
	NA	1104	35	1410	95.395	1410	1410	1410	1410	1	1	989	3176.4
	M	1104	35	982	100	982	982	982	982	1	1	989	7693
	HA	1104	35	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	989	7017.7
A/Piura/INS4_288/2016	**PB1**	397	10	2274	99.444	2274	2274	2274	2274	1	1	1605	2965
	PB2	397	10	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	1605	1844.6
	PA	397	10	2151	99.91	2151	2151	2151	2151	1	1	1605	4495
	NS	397	10	863	100	863	863	863	863	1	1	1605	7695
	NP	397	10	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	1605	4468.4
	NA	397	10	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	1605	2626.3
	M	397	10	982	100	982	982	982	982	1	1	1605	7680.4
	HA	397	10	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	1605	7355
A/Piura/INS4_294/2016	**PB1**	1321	24	2274	100	2274	2274	2274	2274	1	1	897	120
	PB2	1321	24	2280	99.954	2280	2280	2280	2280	1	1	897	107.4
	PA	1321	24	2151	99.875	2151	2151	2151	2151	1	1	897	444.3
	NS	1321	24	863	100	863	863	863	863	1	1	897	1637.5
	NP	1321	24	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	897	176.6
	NA	1321	24	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	897	193.8
	M	1321	24	982	100	982	982	982	982	1	1	897	2244.8
	HA	1321	24	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	897	290.2

A/Piura/INS4_888/2016	**PB1**	191	12	2274	100	2274	5412	2274	2274	1	1	1952	1520.1
	PB2	191	12	2280	100	2280	4601	2280	2280	1	1	1952	654.6
	PA	191	12	2151	99.955	2151	3500	2151	2151	1	1	1952	2877.5
	NS	191	12	863	98.976	863	4350	863	863	1	1	1952	7532.3
	NP	191	12	1497	98.989	1497	2548	1497	1497	1	1	1952	1755.6
	NA	191	12	1410	99.656	1410	1450	1410	1410	1	1	1952	672.7
	M	191	12	982	100	982	1016	982	982	1	1	1952	7441.5
	HA	191	12	1701	100	1701	1751	1701	1701	1	1	1952	3655.6
A/Puno/INS6_006/2016	**PB1**	599	24	2274	100	2274	2274	2274	2274	1	1	905	155.6
	PB2	599	24	2280	98.357	2280	2280	2280	2280	1	1	905	160.3
	PA	599	24	2151	99.955	2151	2151	2151	2151	1	1	905	404.6
	NS	599	24	863	100	863	1546	863	863	1	1	905	250.7
	NP	599	24	1497	99.157	1497	1497	1497	1497	1	1	905	478.6
	NA	599	24	1410	99.419	1410	1410	1410	1410	1	1	905	151.8
	M	599	24	982	99.606	982	982	982	982	1	1	905	2689.5
	HA	599	24	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	905	658.8
A/Arequipa/INS6_950/2016	**PB1**	606	20	2274	99.701	2274	2274	2274	2274	1	1	981	2928.4
	PB2	606	20	2280	99.242	2280	2280	2280	2280	1	1	981	2978.7
	PA	606	20	2151	98.373	2151	2151	2151	2151	1	1	981	3848.7
	NS	606	20	863	100	863	863	863	863	1	1	981	7694.4
	NP	606	20	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	981	2872.1
	NA	606	20	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	981	3000.8
	M	606	20	982	100	982	982	982	982	1	1	981	7466.5
	HA	606	20	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	981	6343.1
A/Arequipa/INS8_499/2016	**PB1**	247	5	2274	100	2274	2274	2274	2274	1	1	2592	826.3
	PB2	247	5	2280	100	2280	2280	2280	2280	1	1	2592	990.5
	PA	247	5	2151	99.955	2151	2151	2151	2151	1	1	2592	1729.1
	NS	247	5	863	100	863	863	863	863	1	1	2592	7628.9
	NP	247	5	1497	100	1497	1497	1497	1497	1	1	2592	2060.1
	NA	247	5	1410	100	1410	1410	1410	1410	1	1	2592	2250.8
	M	247	5	982	100	982	982	982	982	1	1	2592	7448.8
	HA	247	5	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	2592	3333
A /Tumbes/INS4_860/2016	**PB1**	439	6	2274	94.829	2274	2274	2274	2274	1	1	1834	3009.2
	PB2	439	6	2280	78.44	1281	1882	1281	601	1	2	1834	203.3
	PA	439	6	2151	90.987	2151	2151	2151	2151	1	1	1834	4411
	NS	439	6	863	99.772	863	863	863	863	1	1	1834	7422.6
	NP	439	6	1497	56.041	1872	1272	872	604	1	2	1834	324.6
	NA	439	6	1410	99.656	1410	1410	1410	1410	1	1	1834	2937.3
	M	439	6	982	100	982	982	982	982	1	1	1834	7673.5
	HA	439	6	1701	100	1701	1701	1701	1701	1	1	1834	6604

Los datos indican que se pudo ensamblar con éxito el genoma completo determinado por segmentos para los aislados secuenciados por NGS. Obteniendo desde 109 contigs para el aislado A/Lima/INS4_403/2016 hasta 1321 contigs para el aislado A/Piura/INS4_294/2016. Asi mismo, mas de 5 contigs presentaron un tamaño mayor a 1000 bp para el aislado A/Arequipa/INS8_499/2016 hasta 35 contigs de tamaño mayor a 1000 bp para el aislado A/Pasco/INS6_335/2016. Tambien, se obtuvo que en la mayoria casos un (01) solo contig contenia la secuencia completa de cada fragmento del genoma de los 20 aislamientos analizados.

En la mayoria de aislamientos se obtuvo mas del 90% genoma secuenciados con respecto a la referencia. Sin embargo, en algunos aislados se obtuvo porcentajes mas bajos como: el aislamiento A/Lambayeque/INS5_790/2015 presenta el 68.4% para el segmento NS secuenciado, el aislamiento A/Lima/LIMAM16_372/2016 presenta un 70.1% del segmento NP secuenciado, el aislamiento A/Pasco/INS6_335/2016 se obtuvo un 68.5% del segmento PB1 secuenciado y 70,5% del segmento PB2 secuenciado, el aislado A /Tumbes/INS4_860/2016 presenta el 78,4% del segmento PB2 secuenciado y 56,041% del segmento NP secuenciado. La cobertura promedio de estos contigs esta alrededor del 200x y el indicador LGA75 (número de contigs necesario para cubrir el 75% del genoma de referencia) es igual a 2, indicando que se requiere de 2 contigs para completar el fragmento.

c. Edición manual

Se editaron los genomas por segmentos usando MEGA-7, y teniendo en cuenta los reads mapeados con el programa IGV para completar los segmentos del genoma. Para ello se cargo a IGV el genoma de referencia; y las fastq filtrados y mapeados al genoma de referencia (archivo con extensión sorted.rmdup.bam y bam.bai); en las figuras 18 al 25, se puede observar los reads alineados por cada segmento del aislado A/Puno/INS6_006/2016. Adicionalmente, se corroboro visualmente todas las variaciones nucleotidicas presentes en los reads a lo largo de los ocho segmentos,

considerando la estadistica de su frecuencia en los reads ensamblados. Los genomas editados son los usados para el análisis filogenético.

Estos genomas serán compartidos en la base internacional de GISAID previa a su publicación.

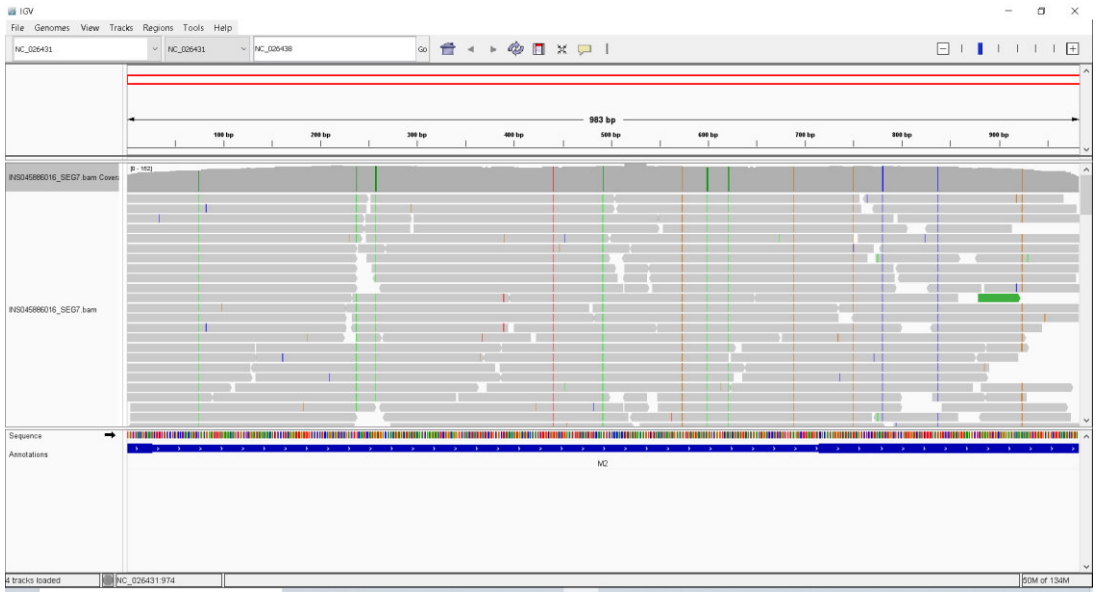


Figura 18. Distribución de reads alineados del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026431 segmento 7.

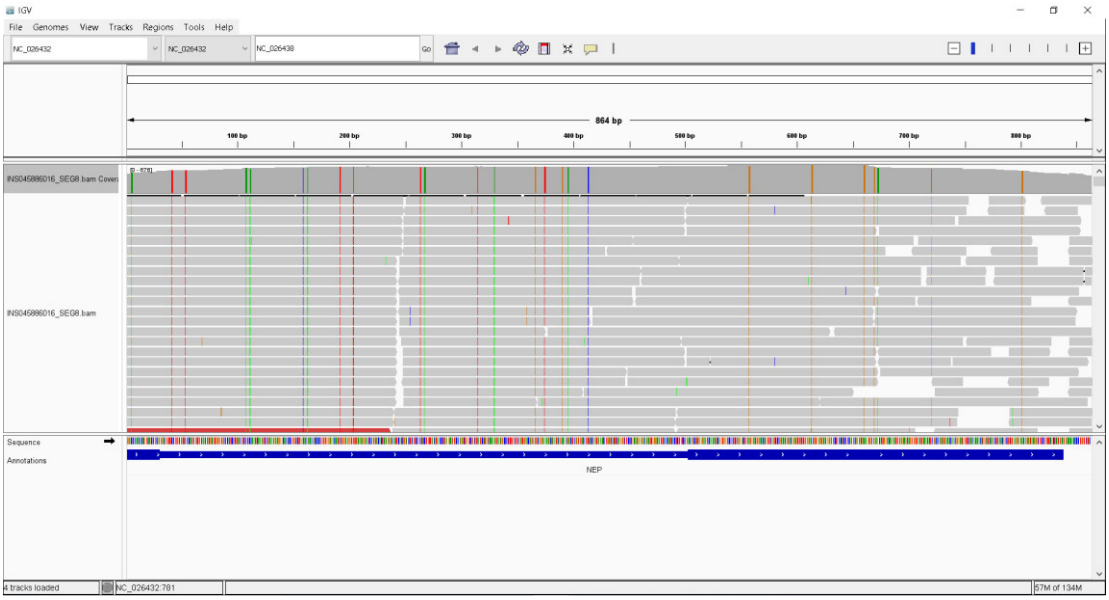


Figura 19. Distribución de reads alineados del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026432 segmento 8.

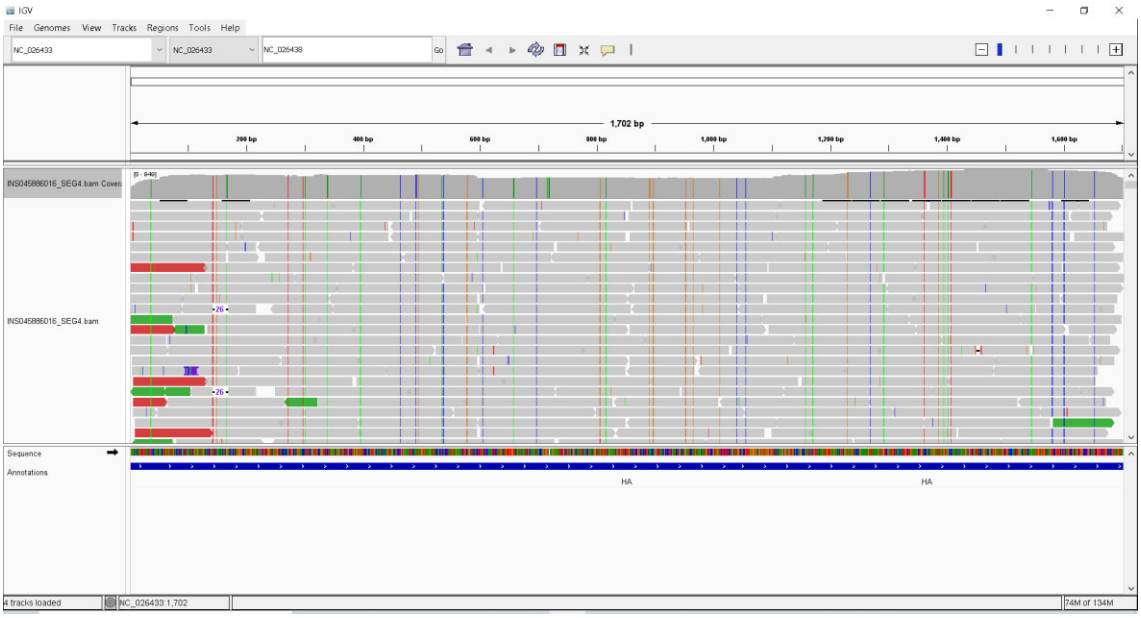


Figura 20. Distribución de read del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026433 segmento 4

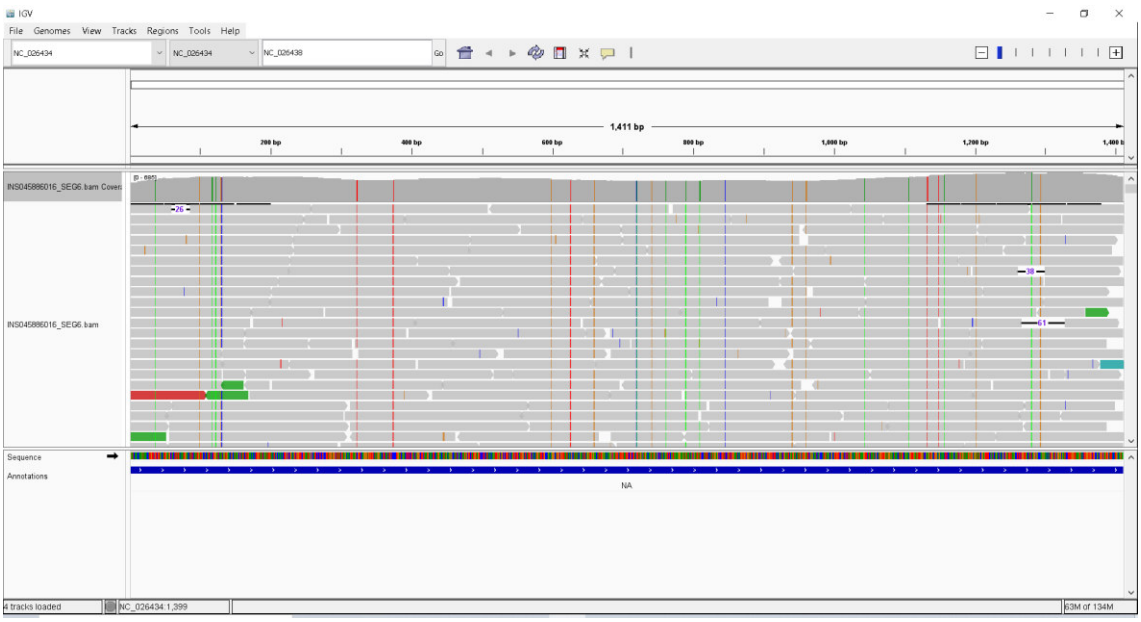


Figura 21. Distribución de reads alineados del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026434 segmento 6.

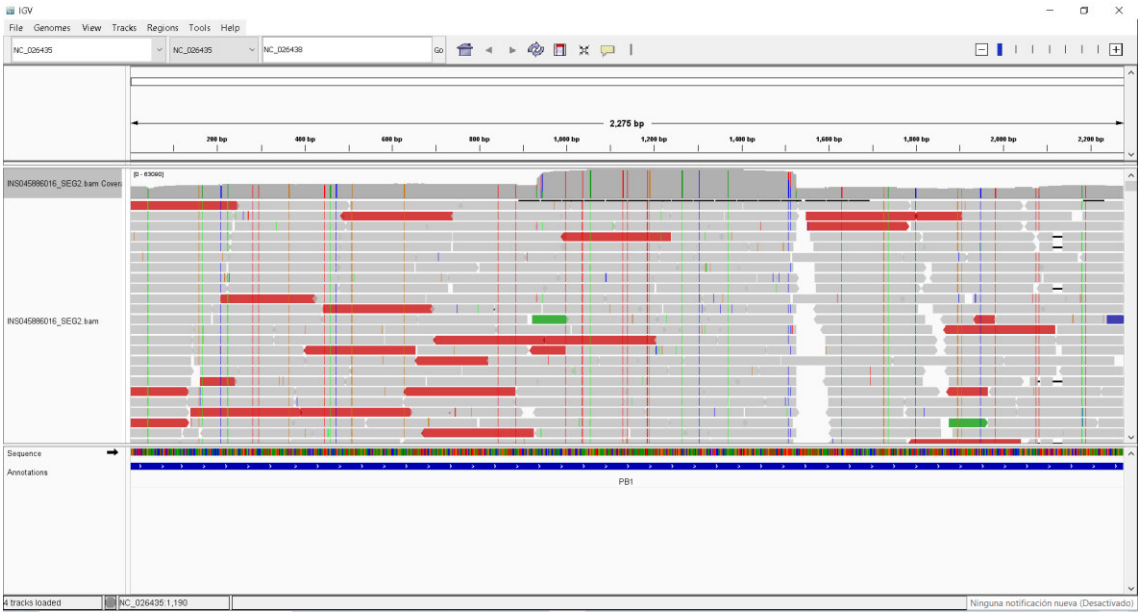


Figura 22. Distribución de reads alineados del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026435 segmento 2.

Figura 23. Distribución de reads alineados del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026436 segmento 5.

Figura 24. Distribución de reads alineados del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026437 segmento 3.

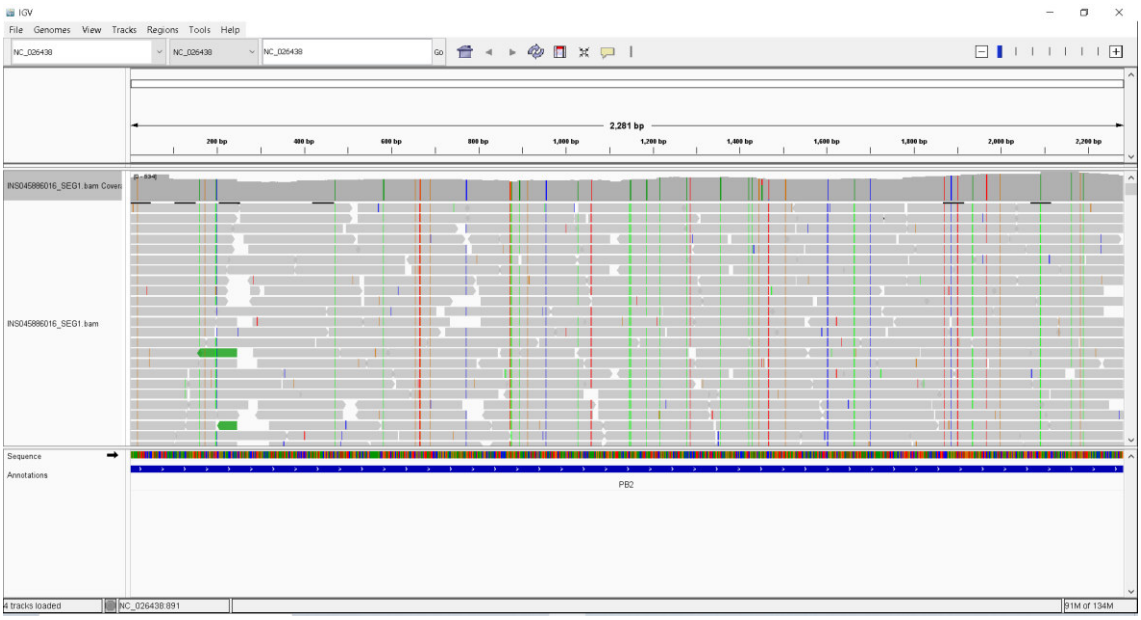


Figura 25. Distribución de reads alienados del aislado A/Puno/INS6_006/2016 con respecto al genoma de referencia NC_026438 segmento 1.

5.2.3. Análisis filogenético del genoma completo del virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislados peruanos

El análisis filogenético y la identificación del ancestro común más reciente del genoma completo del virus influenza A(H1N1)pdm09 de muestras peruanas fue analizado mediante la secuenciación de 20 muestras que circularon durante los años 2015 y 2016 correspondientes a los genotipos identificados por HRM.

Estas secuencias se alinearon con 11 muestras peruanas del departamento de Lima, aisladas durante el 2009, 2012 y 2013, con la cepa Vacunal A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 2015-2016 (CDC, 2016), cepas referenciales descritas para america del sur en el 2009: A/California/04/2009, A/California/06/2009, A/Vladivostok/01/2009, A/Sakai/1/2009, A/Amagasaki/1/2009, A/Canada-PQ/RV1758/2009, A/Canada-MB/RV1964/2009, A/Quebec/144147/2009, A/California/14/2009 y A/Massachusetts/06/2009 (Goñi *et al.*, 2010) obtenidas del GenBank y cepas referenciales del 2015 y 2016 descritas por Hadfield *et al.,* (2018) (https://nextstrain.org) obtenidas de la base de datos GISAID descritas en la Tabla 8.

Todas las secuencias alineadas con el programa MEGA 7 por segmento (Figura 26), fueron cortadas en sus extremos con el programa online Gblocks. Los genomas alineados fueron analizados con el programa Jmodel Test para la identificación del mejor modelo de sustitución (Tabla 9), encontrando que; los 8 segmentos PB2: GTR+I, PB1: GTR+G, PA: GTR+I+G, HA:GTR+I+G, NP: GTR+G, NA: HKY+G, M:SYM+I y NS: GTR+G tienen modelos diferentes.

Para la generación del árbol filogenético se usó el programa BEAST v2.5.0, con los mejores modelos de sustitución, con un modelo de reloj molecular estricto y modelo de árbol Yule Model con MCMC de 632 000 millones de pasos.

Figura 26. Alineamiento del segmento de la Haemaglutinina HA de los genomas del virus influenza A(H1N1)pdm09 usando el programa MEGA7.

Tabla 8. Metabase de cepas referenciales 2015 – 2016

CEPAS REFERENCIALES	ISLOTE ID	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	CLADO
A/Bangladesh/3002/2015	EPI_ISL_193001	EPI630390	EPI630391	EPI630389	EPI630393	EPI630386	EPI630392	EPI630388	EPI630387	6B
A/Indiana/21/2016	EPI_ISL_213274	EPI717207	EPI717208	EPI717206	EPI717210	EPI717203	EPI717209	EPI717205	EPI717204	6B
A/Minnesota/32/2015	EPI_ISL_195816	EPI643390	EPI643391	EPI643389	EPI643393	EPI643386	EPI643392	EPI643388	EPI643387	6B
A/Michigan/45/2015	EPI_ISL_199532	EPI662591	EPI662592	EPI662590	EPI662594	EPI662587	EPI662593	EPI662589	EPI662588	6B1
A/Brisbane/181/2015	EPI_ISL_209042	EPI782608	EPI782609	EPI782607	EPI704084	EPI782605	EPI704083	EPI704082	EPI782606	6B1
A/Texas/157/2016	EPI_ISL_232628	EPI827917	EPI827918	EPI827916	EPI827920	EPI827913	EPI827919	EPI827915	EPI827914	6B1
A/Fiji/3/2016	EPI_ISL_227597	EPI979646	EPI868670	EPI868671	EPI793049	EPI868672	EPI793048	EPI868673	EPI868674	6B1
A/Panama/318595/2016	EPI_ISL_230523	EPI815673	EPI815674	EPI815672	EPI815676	EPI815669	EPI815675	EPI815671	EPI815670	6B1
A/Montana/50/2016	EPI_ISL_238780	EPI862976	EPI862977	EPI862975	EPI862979	EPI862972	EPI862978	EPI862974	EPI862973	6B1
A/California/174/2016	EPI_ISL_241640	EPI880117	EPI880118	EPI880116	EPI880120	EPI880113	EPI880119	EPI880115	EPI880114	6B1
A/Bolivia/559/2013	EPI_ISL_145507	EPI466894	EPI466895	EPI466893	EPI466897	EPI466890	EPI466896	EPI466892	EPI466891	6B
A/Uganda/1625/2014	EPI_ISL_176803	EPI580161	EPI580162	EPI580160	EPI580164	EPI580157	EPI580163	EPI580159	EPI580158	6
A/Uganda/856/2014	EPI_ISL_176806	EPI580182	EPI580183	EPI580181	EPI580185	EPI580178	EPI580184	EPI580180	EPI580179	6

Tabla 9. Análisis de Jmodel Test para los segmentos del genoma de virus influenza A(H1N1)pdm09

Jmodel Test	BAYESIAN INFORMATION CRITERION (BIC)							
	PB1	**PB2**	**PA**	**HA**	**NP**	**NA**	**M**	**NS**
Model	GTR+I	GTR+G	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+G	HKY+G	SYM+I	GTR+G
Partition	12345	12345	12345	12345	12345	10010	12345	12345
-lnL	7286.6457	7559.7245	9629.6964	9629.6964	4109.1735	3962.9999	2534.0774	2335.4818
K	99	99	100	100	99	95	96	99
freqA	0.3592	0.3457	0.3394	0.3394	0.3296	0.3262	-	0.3173
freqC	0.193	0.1811	0.1915	0.1915	0.1973	0.1895	-	0.1939
freqG	0.2191	0.2513	0.2334	0.2334	0.2606	0.2263	-	0.2403
freqT	0.2288	0.2219	0.2358	0.2358	0.2125	0.2579	-	0.2485
R(a) [AC]	2.1864	1.577	2.1442	2.1442	3.1685	8.0852	2.0708	3.7769
R(b) [AG]	10.7902	7.8423	7.3983	7.3983	13.8036	-	7.562	12.9529
R(c) [AT]	1.6962	1.4048	1.5608	1.5608	3.174	-	1.8087	0.9588
R(d) [GC]	0.5082	0.3594	0.4375	0.4375	0.1298	-	0.01	0.0131
R(e) [CT]	15.2039	11.3036	9.6549	9.6549	18.0361	-	5.6536	11.8164
R(f) [GT]	1	1	1	1	1	-	1	1
p-inv	0.605	-	-	-	-	-	0.518	-
gamma shape	-	0.599	0.69	0.69	0.31	0.399	-	0.373
Kappa	-	-	-	-	-	8.0852 (ti/tv = 4.0132)	-	-

El análisis filogenético se realizó utilizando inferencia bayesiana a través de las cadenas de Markov (MCMC) usando el programa BEAST v2.5.0, se concatenó los 8 segmentos, se usó un modelo de reloj molecular estricto y los modelos de árboles Bayesian Skyline y Yule Model, con una generación de 632 000 de la longitud de MCMC.

La distribución de probabilidad de los datos fue analizada con el programa Tracer, los indicadores de los parámetros fueron mayores a 200 indicando que el muestreo fue adecuado, obteniendo una probabilidad posterior media de -52930. En la figura 27, se observa la probabilidad a lo largo de las generaciones, observandose que se encuentran entre -52960 a -52890, la zona gris inicial corresponde al filtrado de los primeros 10% de datos (burning) que no considerados en el análisis.

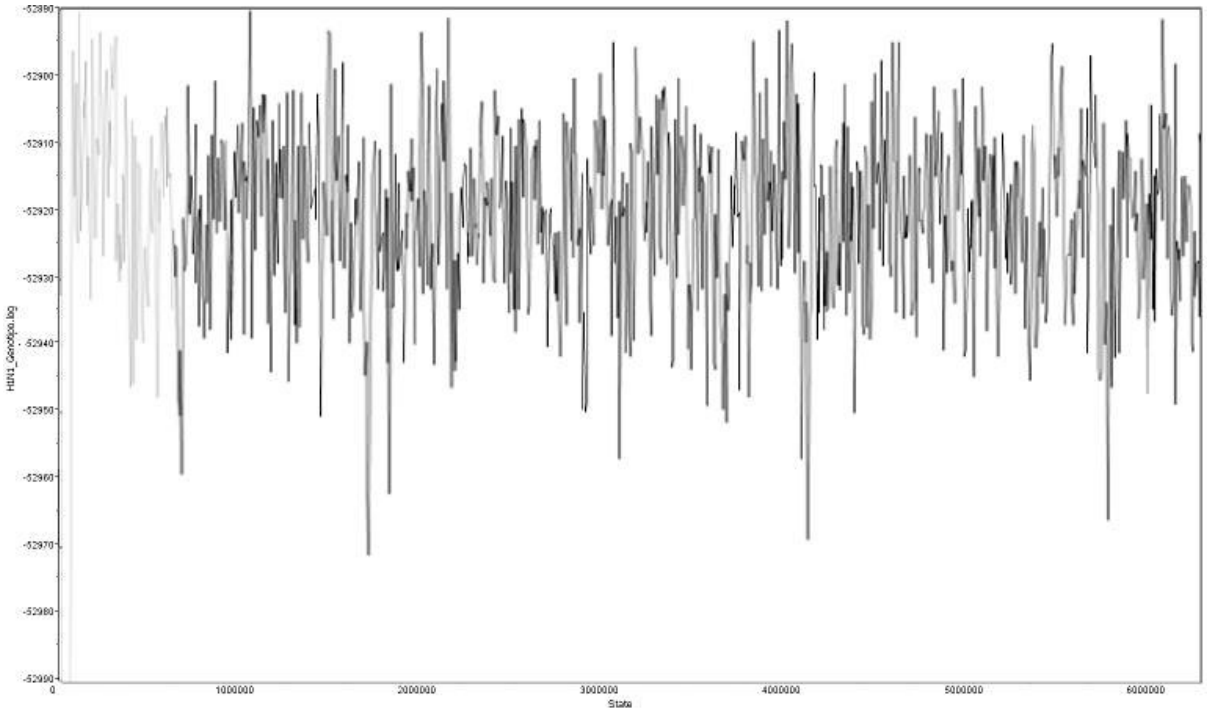


Figura 27. Distribución de la probabilidad a lo largo de las generaciones usando Tracer.

Para la obtención del árbol más creible se usó TreeAnnotator, este árbol fue visualizado y editado usando el programa FigTree v1.4.2.

Del árbol filogenético del genoma completo (Figura 28) se pudo analizar que las muestras correspondientes al año 2015 se encuentran agrupadas en el Clado 6B y del año 2016 en el clado 6B1, con un buen soporte de probabilidad posterior. Los aislados peruanos fueron agrupados en clados importates de acuerdo al año del aislamiento, estos clados están relacionados entre sí.

Los aislados peruanos del 2009 se encuentran agrupadas con las cepas referenciales del 2009 mostrando una distribución alterna entre los clados 3, 6 y 7. Los aislados peruanos del 2012 se encuentran junto con la cepa A/Mexico_City/INER1149/2012. El aislado peruano del 2013 se encuentra agrupada con las cepas de A/Uganda/1625/2014 y A/Uganda/856/2014 cuya clasificación actual enmarca al clado 6. Los aislados peruanos del 2015 se encuentran en relación con las cepas A/Minesota/32/2015, A/Indiana/21/2016 correspondientes al clado 6B. Los aislados peruanos del 2016 se encuentran en el clado que agrupa a la cepa A/Michigan/45/2015, A/Brisbane/181/2015, A/California/174/2016, A/Texas/157/2016, A/Fiji/3/2016, A/Panama/318595/2016, A/India/9574/2016 y A/Montana/50/2016.

De las muestras secuenciadas del 2015 y 2016 se puede observar subgrupos que corresponderían a los genotipos identificados por High Resolution Melting, el genotipo I corresponde a las cepas A/LaLibertad/INS5_380/2015 y A/Lambayeque/INS5_514/2015 con soporte de 1, genotipo II con las aislados A/Cusco/INS5_825/2015 y A/Lambayeque/INS5_790/2015 con soporte de probabilidad posterior (PP) de 1, el genotipo III uno de los menos frecuentes correspondientes a los aislados A/Arequipa/INS5_081/2016 y A/Arequipa/INS6_868/2016 se encuentran no asociados, el genotipo IV A/Tumbes/INS4_860/2016 y A/Lima/INS3_701/2016 estan relacionados filogenetixamente por antecesores, el genotipo V con los aislados de A/Piura/INS4_888/2016 y A/Arequipa/INS6_950/2016 tienen un soporte de PP: 0,99,

el genotipo VI A/Ancash/INS4_421/2016 y A/Arequipa/INS8_499/2016 se encuentra relacionada filogeneticamente por antecesores, el genotipo VII con los aislados A/Lima/LIMAM16_372/2016 y A/Puno/INS6_006/2016 tienen un soporte de PP:1, el genotipo VIII con los aislados A/Piura/INS4_288/2016 y A/Lima/INS4_403/2016 tienen un soporte de PP:1, el genotipo IX con los aislados A/Pasco/INS6_335/2016 y A/Piura/INS4_294/2016 no se encuentran relacionados filogeneticamente siendo el aislado de A/Piura/INS4_294/2016 relacionado al genotipo IV y el aislado A/Pasco/INS6_335/2016 asociado al genotipo V y el genotipo X con los aislados A/Loreto/INS5_168/2016 y A/Arequipa/INS5_881/2016 se encuentran relacionados filogenéticamente con un soporte de PP: 0,57.

Los aislados peruanos se agrupan con la cepa vacunal A/California/7/2009(H1N1)pdm09 y A/California/4/2009 (H1N1)pdm09 originarias de la pandemia del 2009. Se usaron dos cepas refereniciales como out-group A/New_Caledonia/20/1999 y A/Brisbane/59/2007 descritas como cepas de Influenza A (H1N1) originarias antes de la pandemia del 2009 (Figura 28).

Adicionalmente se generó el árbol filogenético para el gen hemaglutinina con la finalidad de comparar topológicamente con el árbol filogenético del genoma completo. Para ello se realizó el análisis de inferencia bayesiana con el software BEAST v2.5.0, modelo de sustitución HA: GTR+I+G, modelo de reloj molecular estricto, modelo de árbol Yule Model y MCMC de 1 000 millones (Figura 29).

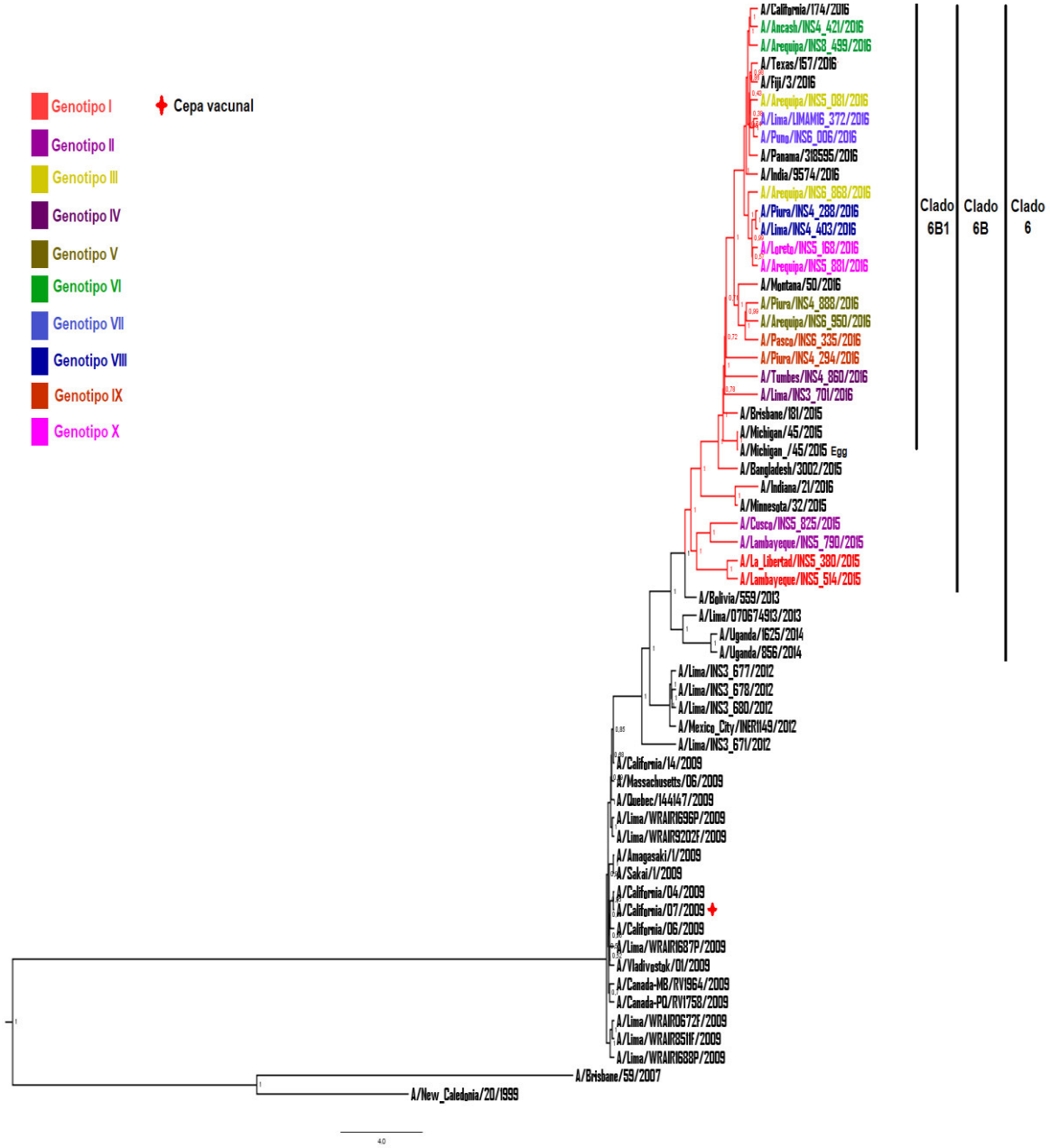


Figura 28. Árbol filogenético del genoma completo del Virus Influenza A(H1N1)pdm09. Análisis de inferencia bayesiana con el software BEAST v2.5.0, modelo de sustitución para PB2: GTR+I, PB1: GTR+G, PA: GTR+I+G, HA:GTR+I+G, NP: GTR+G, NA: HKY+G, M:SYM+I y NS: GTR+G. Modelo de reloj molecular estricto. Modelo de árbol Yule Model. MCMC de 632 000 millones. Las cepas del árbol se muestras con sus nombres, y de colores los representantes de los genotipos identificados por HRM. Se señala la cepa vacunal 2015-2016 A/California/07/2009 y la clasificación para el 2015 y 2016. Los nodos muestran el valor de la

probabilidad posterior. Se muestran dos cepas como out-group A/New_Caledonia/20/1999 y A/Brisbane/59/2007.

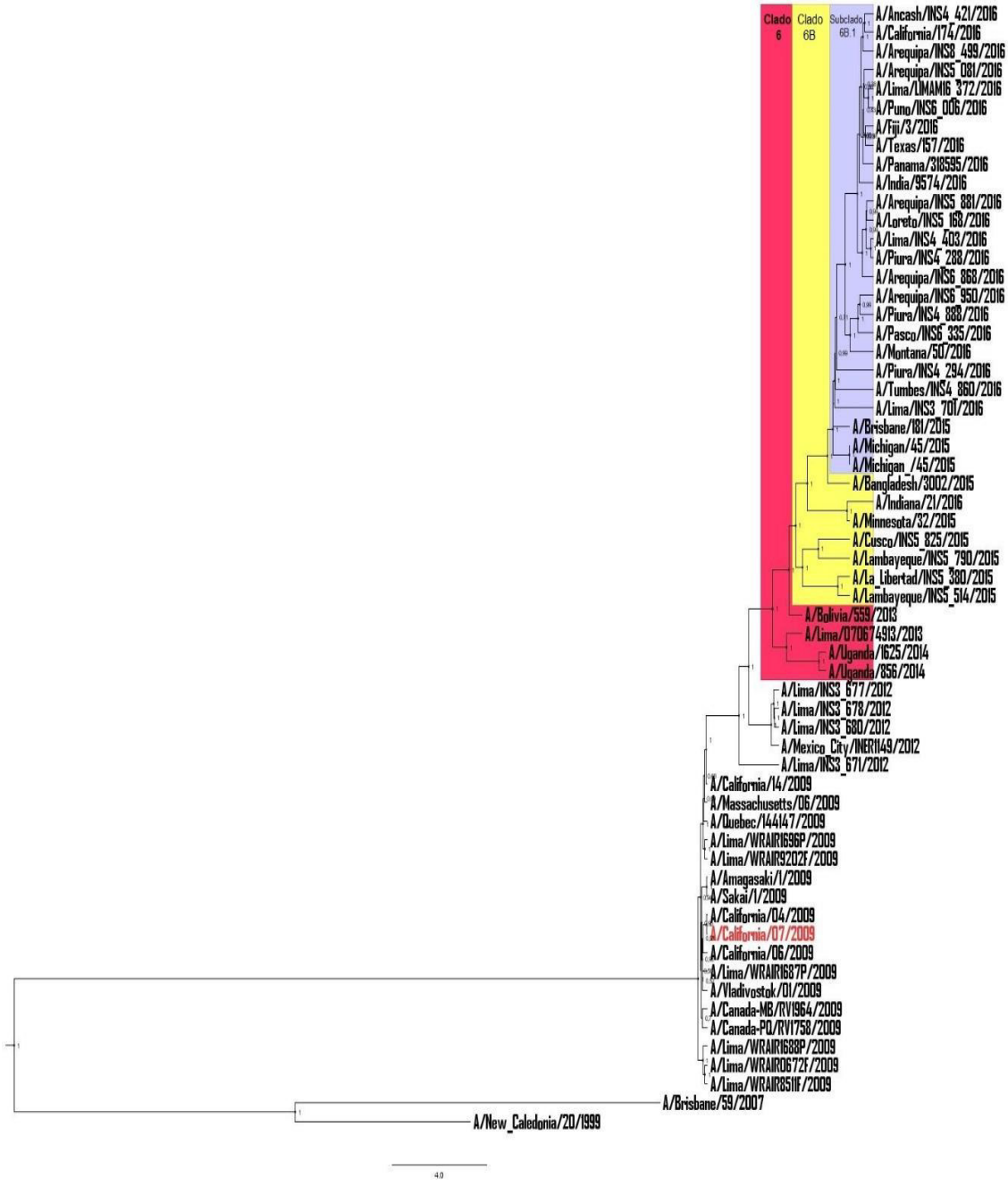


Figura 29. Árbol filogenético del gen Hemaglutinina del Virus Influenza A(H1N1)pdm09. Análisis de inferencia bayesiana con el software BEAST v2.5.0, modelo de sustitución GTR+I+G. Modelo de reloj molecular estricto. Modelo de árbol Yule Model. MCMC de 1 000 millones. Las cepas del árbol se muestran con sus nombres, y de colores los representantes

la clasificación de los clados. Los nodos muestran el valor de la probabilidad posterior. Se muestran dos cepas como out-group A/New_Caledonia/20/1999 y A/Brisbane/59/2007.

El análisis Skyline Bayesian muestra como el tamaño efectivo de la población viral de Influenza A varia en el tiempo, la figura muestra un quiebre en el 2009 que coincide con la pandemia que se produjo durante ese año de H1N1pdm09, a partir del 2009 el tamaño efectivo de la población es constante hasta el 2015 donde se observa un incremento que también coincide con un brote en el Perú (Figura 30).

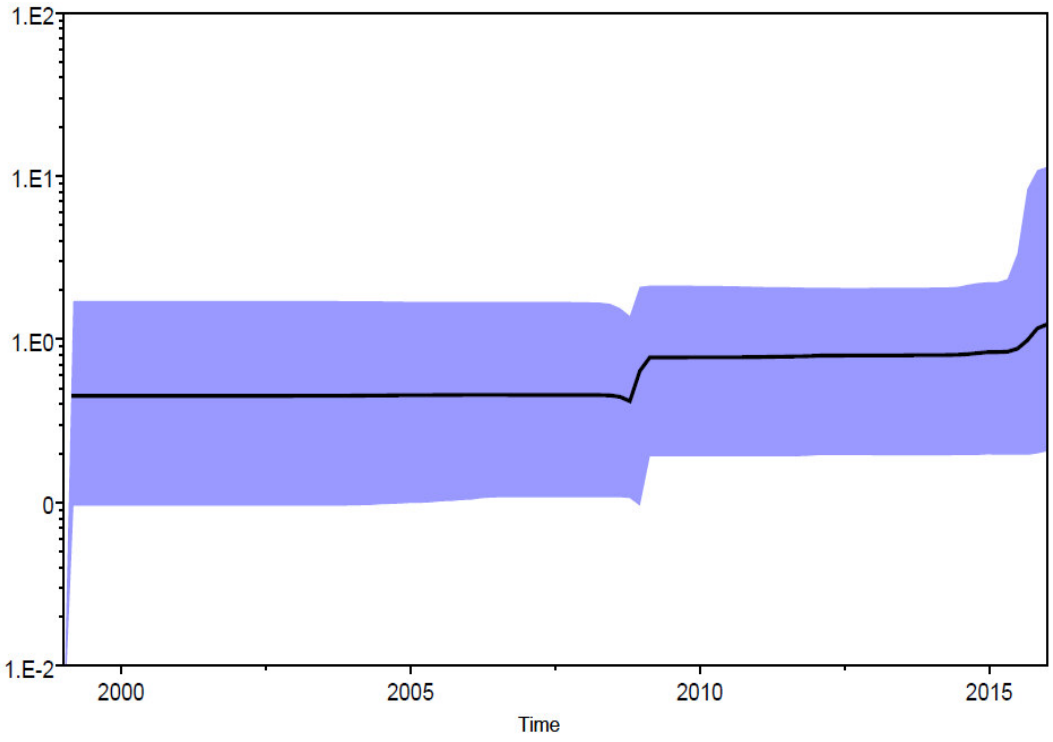


Figura 30. Análisis Skyline Bayesian del Virus Influenza A. El análisis se realizó usando el modelo GTR+G considerando reloj molecular estricto con MCMC de 10 000 millones de pasos. El eje Y representa el tamaño efectivo de la población en una escala logarítmica y el eje X representa el tiempo de generación en años. La línea solida representa el valor posterior mediano en el tiempo. El área sombreada en azul representa los intervalos del 95% de densidad de la probabilidad más alta (HPD).

5.2.4. Identificación de variantes antigénicas en aminoácidos de los 8 segmentos del genoma viral de Influenza A(H1N1)pdm09

Las variaciones aminoácidicas halladas por secuenciación masiva del genoma viral de influenza A(H1N1)pdm09 se encuentran distribuidos en los 8 segmentos que compreden el genoma (Tabla 10 - 17).

En el segmento PB2 se identifaron 9 mutaciones aminoacidicas en la mayoría de los aislados peruanos como: R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T y V731I, se identificaron también otras mutaciones en menor proporción en algunos aislados como E69V, A95S, T105K, A184T, I463V, R591Q, V613A, E627K, L645M, T147I, T524N, S155N, V511I, M535L (Tabla 10).

TABLA 10. Sustitución de aminoácidos del segmento PB2 en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.

AISLADOS	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	98.739	98.654	10	R54K, M66I, A95S, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Arequipa/INS5_081/2016	98.814	100	9	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Arequipa/INS5_881/2016	98.137	100	9	R54K, M66I A95S, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, V731I
A/Arequipa/INS6_868/2016	98.753	100	10	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, I559V, V731I
A/Arequipa/INS8_499/2016	98.946	98.484	9	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Cusco/INS5_825/2015	98.946	100	8	R54K, M66I, A184T, D195N, R293K, V344M, I354L, V731I
A/La_Libertad/INS5_380/2015	96.335	100	13	R54K M66I, A184T, D195N, R293K, V344M, I354L, I463V, R591Q, V613A, E627K, L645M, V731
A/Lambayeque/INS5_514/2015	96.335	100	13	R54K M66I, A184T, D195N, R293K, V344M, I354L, I463V, R591Q, V613A, E627K, L645M, V731
A/Lambayeque/INS5_790/2015	98.946	100	8	R54K, M66I, A184T, D195N, R293K, V344M, I354L, V731I
A/Lima/INS3_701/2016	98.814	100	9	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Lima/INS4_403/2016	98.636	100	9	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Lima/LIMAM16_372/2016	98.551	100	11	R54K, M66I, T147I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, T524N, V731I
A/Pasco/INS6_335/2016	98.201	100	8	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Piura/INS4_288/2016	98.691	98.501	11	R54K, M66I S155N, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V511I, V731I
A/Piura/INS4_294/2016	98.946	100	8	R54K, M66I, D195N, R293K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Piura/INS4_888/2016	98.682	100	10	R54K, M66I, E69V, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Puno/INS6_006/2016	98.636	98.31	7	R54K, M66I, D195N, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Tumbes/INS4_860/2016	98.682	100	10	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, M535L, V731I
A/Arequipa/INS6_950/2016	98.682	100	10	R54K, M66I, T105K, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I
A/Loreto/INS5_168/2016	98.946	100	9	R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T, V731I

En el segmento PB1 se identificaron 3 variaciones entre todos los aislados peruanos como: G154D, I397M y I435T, se identificaron también otras mutaciones en algunos aislados en menor proporción como E60K, G62T, P64S, G154D, M195V, I298N, I364V, H456Y, T183I, V517I, A652V, N413K, K433P, T434C, H456Y, N175D, R211K, R327K, D638E, V709I, V728I (Tabla 11).

TABLA 11. Sustitución de aminoácidos del segmento PB1 en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.

AISLADOS	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	98.711	92.206	9	**E60K, G62T, P64S, G154D, M195V, I298N, I397M, I435T, H456Y**
A/Arequipa/INS5_081/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Arequipa/INS5_881/2016	99.181	96.83	6	**G154D, T183I, I397M, I435T, V517I, A652V**
A/Arequipa/INS6_868/2016	99.472	100	4	**G154D, I364V, I397M, I435T**
A/Arequipa/INS6_950/2016	94.189	97.754	6	**G154D, I397M, N413K, K433P, T434C, I435T**
A/Arequipa/INS8_499/2016	99.472	100	4	**G154D, I397M, I435T, H456Y**
A/Cusco/INS5_825/2015	99.339	100	5	**G154D, N175D, R211K, I397M, I435T**
A/La_Libertad/INS5_380/2015	97.226	100	7	**G154D, R327K, I397M I435T, D638E, V709I, V728I**
A/Lambayeque/INS5_514/2015	98.684	98.119	6	**G154D, I397M, I435T, D638E, V709I, V728I**
A/Lambayeque/INS5_790/2015	98.573	98.54	8	**E60K, G62T, P64S, G154D, N175D, R211K, I397M, I435T**
A/Lima/INS3_701/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Lima/INS4_403/2016	99.191	99.009	3	**P394H, I397M, I435T**
A/Lima/LIMAM16_372/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Loreto/INS5_168/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Pasco/INS6_335/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Piura/INS4_288/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Piura/INS4_294/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Piura/INS4_888/2016	99.736	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Puno/INS6_006/2016	99.604	100	3	**G154D, I397M, I435T**
A/Tumbes/INS4_860/2016	98.558	100	3	**G154D, I397M, I435T**

En el segmento PA se identificaron variaciones en los dos genes que comprenden este segmento, el gen PA se identificaron 4 variaciones entre la mayoría de los aislados peruanos tales como: P224S, N321K, I330V, y R362K; en el gen PA-X se identificaron 4 variaciones en común entre los aislados peruanos analizados: V100I, R221Q, N204S y L229S (Tabla 12).

TABLA 12. Sustitución de aminoácidos del segmento PA en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.

AISLADO	GEN	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	98.837	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, I545V**
A/Ancash/INS4_421/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Arequipa/INS5_081/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.162	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, V521A**
A/Arequipa/INS5_081/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Arequipa/INS6_868/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.302	100	4	**P224S, N321K, I330V, R362K**
A/Arequipa/INS6_868/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Arequipa/INS6_950/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.022	100	6	**P224S, N321K, I330V, R362K, A448S, V521A**
A/Arequipa/INS6_950/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Arequipa/INS8_499/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	98.778	98.575	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, R490K**
A/Arequipa/INS8_499/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Cusco/INS5_825/2015	PA A/California/07/2009(H1N1)	97.765	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, L649I**
A/Cusco/INS5_825/2015	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/La_Libertad/INS5_380/2015	PA A/California/07/2009(H1N1)	93.603	92.961	14	**P224S, N321K, I330V, R362K, P400L, A404S, V407I, N409S, S421V, L550I, T552S, V557I, I573V, T618A,**
A/La_Libertad/INS5_380/2015	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Lambayeque/INS5_514/2015	PA A/California/07/2009(H1N1)	93.487	91.48	13	**P224S, N321K, I330V, R362K, P400L, A404S, V407I, N409S, S421V, T552S, V557I, I573V, T618A,**
A/Lambayeque/INS5_514/2015	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Lambayeque/INS5_790/2015	PA A/California/07/2009(H1N1)	98.883	100	7	**P224S, T263M, N321K, I330V, K361R, R362K, L649I**
A/Lambayeque/INS5_790/2015	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Lima/INS3_701/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.162	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, V521A**
A/Lima/INS3_701/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Lima/INS4_403/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	90.83	93.966	6	**P224S, N321K, I330V, R362K, A448S, V521A**
A/Lima/INS4_403/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Lima/LIMAM16_372/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.302	100	4	**P224S, N321K, I330V, R362K**
A/Lima/LIMAM16_372/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Pasco/INS6_335/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	98.38	94.832	6	**K134T, S140V, P224S, N321K, I330V, R362K**
A/Pasco/INS6_335/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Piura/INS4_288/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.917	98.223	6	**P224S, N321K, P332L, R362K, N519S, V521A**
A/Piura/INS4_288/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Piura/INS4_294/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.162	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, T570A**
A/Piura/INS4_294/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Piura/INS4_888/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.162	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, V628M**
A/Piura/INS4_888/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Puno/INS6_006/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.162	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, V521A**
A/Puno/INS6_006/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Tumbes//INS4_860/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.035	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, E399D**
A/Tumbes//INS4_860/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Arequipa/INS5_881/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	99.505	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, E399D**
A/Arequipa/INS5_881/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**
A/Loreto/INS5_168/2016	PA A/California/07/2009(H1N1)	98.795	100	5	**P224S, N321K, I330V, R362K, E399D**
A/Loreto/INS5_168/2016	PA-X A/California/07/2009(H1N1)	100	100	4	**V100I, N204S, R221Q, L229S**

En el segmento HA se identificaron 14 variaciones en la mayoría de los aislados peruanos analizados: A13T, P100S, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N y, E516K (Tabla 13).

TABLA 13. Sustitución de aminoácidos del segmento HA en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.

AISLADOS	GEN	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	96.725	100	16	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, D502E, E516K
A/Arequipa/INS5_081/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	98.294	98.767	16	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, M274I, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Arequipa/INS5_881/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.174	98.272	16	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, D502E, E516K
A/Arequipa/INS6_868/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.35	100	16	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, P288S, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Arequipa/INS6_950/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.173	100	16	F12L, A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300D, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Arequipa/INS8_499/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	98.294	99.813	14	A13T, P100S, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Cusco/INS5_825/2015	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.397	100	15	A13T, P100S, D114N, S179N, K180Q, S200P, S202T, S220T, A273T,M274I, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/La_Libertad/INS5_380/2015	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.397	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Lambayeque/INS5_514/2015	HA A/California/07/2009(H1N1)	98.485	100	14	A13T, N16K, P100S, D114N, S179N K180Q, S202T, S220T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Lambayeque/INS5_790/2015	HA A/California/07/2009(H1N1)	98.485	100	14	A13T, P100S, D114N, S179N, K180Q, S200P, S202T, S220T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Lima/INS3_701/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.397	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Lima/INS4_403/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.397	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Lima/LIMAM16_372/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.173	100	16	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, M274I, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Loreto/INS5_168/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.397	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Pasco/INS6_335/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.397	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Piura/INS4_288/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.397	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Piura/INS4_288/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.345	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Piura/INS4_294/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.345	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Piura/INS4_888/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.345	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Puno/INS6_006/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.168	100	16	F12L, A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K
A/Tumbes/INS4_860/2016	HA A/California/07/2009(H1N1)	97.345	100	15	A13T, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S202T, S220T, I233T, A273T, K300E, I338V, E391K, S468N, E516K

En el segmento NP se identificaron 2 variaciones en común en todos los aislados peruanos analizados: V100I y S498N (Tabla 14).

TABLA 14. Sustitución de aminoácidos del segmento NP en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016

AISLADO	GEN	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.197	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Arequipa/INS5_081/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.197	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Arequipa/INS6_868/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.639	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Arequipa/INS6_950/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.639	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Arequipa/INS8_499/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.631	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Cusco/INS5_825/2015	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.64	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/La_Libertad/INS5_380/2015	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.127	100	4	**V100I**, **V425I**, **V444I**, **S498N**
A/Lambayeque/INS5_514/2015	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.759	100	4	**V100I**, **V425I**, **V444I**, **S498N**
A/Lambayeque/INS5_790/2015	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.197	100	4	**V100I**, **V425I**, **V444I**, **S498N**
A/Lima/INS3_701/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.678	92.45	2	**V100I**, S498N
A/Lima/INS4_403/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.631	94.418	2	**V100I**, S498N
A/Lima/LIMAM16_372/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.197	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Loreto/INS5_168/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.678	92.45	2	**V100I**, S498N
A/Pasco/INS6_335/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.197	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Piura/INS4_288/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.631	94.418	2	**V100I**, S498N
A/Piura/INS4_294/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.197	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Piura/INS4_888/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.197	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**
A/Puno/INS6_006/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	98.477	91.57	3	**A22T**, **V100I**, **M105T**
A/Tumbes/INS4_860/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.444	92.289	3	**V100I, A323S**, **S498N**
A/Arequipa/INS5_881/2016	NP A/California/07/2009(H1N1)	99.675	100	4	**A22T**, **V100I**, **M105T**, **S498N**

En el segmento NA se identificaron 13 variaciones en todos los aislados peruanos analizados: I34V, L40I, N44S, N200I, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K y K432E (Tabla 15).

TABLA 15. Sustitución de aminoácidos del segmento NA en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.

AISLADO	GEN	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Arequipa/INS5_081/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Arequipa/INS5_881/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Lima/INS3_701/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Loreto/INS5_168/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Piura/INS4_288/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Arequipa/INS6_950/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Puno/INS6_006/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.222	100	15	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Cusco/INS5_825/2015	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.015	100	16	I34V, L40I, N44S, I117M, D199N, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M,I321V, I365T, N369K, N386K, K432E
A/La_Libertad/INS5_380/2015	NA A/California/07/2009(H1N1)	96.38	100	17	V13I, I34V, L40I, N44S, I117M, D199N, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, I365T, N369K, N386K, K432E
A/Lambayeque/INS5_514/2015	NA A/California/07/2009(H1N1)	96.38	100	17	V13I, I34V, L40I, N44S, I117M, D199N, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, I365T, N369K, N386K, K432E
A/Lambayeque/INS5_790/2015	NA A/California/07/2009(H1N1)	97.015	100	16	I34V, L40I, N44S, I117M, D199N, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, I365T, N369K, N386K, K432E
A/Lima/LIMAM16_372/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.767	100	14	I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Pasco/INS6_335/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.767	100	14	I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, D416N, K432E
A/Arequipa/INS8_499/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.767	100	14	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K K432E
A/Lima/INS4_403/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.767	100	14	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, K432E
A/Piura/INS4_294/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.767	100	14	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K K432E
A/Piura/INS4_888/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.767	100	14	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, K432E
A/Tumbes/INS4_860/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.767	100	14	V13I, I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, K432E
A/Arequipa/INS6_868/2016	NA A/California/07/2009(H1N1)	98.175	100	13	I34V, L40I, N44S, N200S, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, N369K, N386K, K432E

En el segmento M se identificaron variaciones en los dos genes que comprenden este segmento, en el gen M1 se identificaron 3 variaciones en común en todos los aislados peruanos analizados: V80I, M192V y K230R; en el gen M2 se identificó 1 variación en todos los aislados peruanos analizados: D21V (Tabla 16).

TABLA 16. Sustitución de aminoácidos del segmento M en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.

AISLADO	GEN	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.394	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Ancash/INS4_421/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	97.647	97.629	3	**D21G**, **D87G, S31N**
A/Arequipa/INS5_081/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Arequipa/INS5_081/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	97.727	90.722	2	**E14G**, **D21G**
A/Arequipa/INS5_881/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	97.479	100	6	**I15V**, **S53P**, **V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Arequipa/INS5_881/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**
A/Arequipa/INS6_868/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Arequipa/INS6_868/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**
A/Arequipa/INS6_950/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.394	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Arequipa/INS6_950/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**
A/Arequipa/INS8_499/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Arequipa/INS8_499/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**
A/Cusco/INS5_825/2015	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **T167A**, **M192V**, **K230R**
A/Cusco/INS5_825/2015	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21V**
A/La_Libertad/INS5_380/2015	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **T167A**, **M192V**, **K230R**
A/La_Libertad/INS5_380/2015	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21V**
A/Lambayeque/INS5_514/2015	M1 A/California/07/2009(H1N1)	94.737	100	4	**V80I**, **T167A**, **M192V**, **K230R**
A/Lambayeque/INS5_514/2015	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21V**
A/Lambayeque/INS5_790/2015	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **T167A**, **M192V**, **K230R**
A/Lambayeque/INS5_790/2015	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.795	95.567	1	**D21V**
A/Lima/INS3_701/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.406	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Lima/INS3_701/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**
A/Lima/INS4_403/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.086	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Lima/INS4_403/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.78	94.536	1	**D21G**
A/Lima/LIMAM16_372/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Lima/LIMAM16_372/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**
A/Loreto/INS5_168/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Loreto/INS5_168/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	97.727	90.722	2	**D21G**, **D85N**
A/Pasco/INS6_335/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	99.291	100	1	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Pasco/INS6_335/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	97.727	90.722	2	**E14G**, **D21G**
A/Piura/INS4_288/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.394	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Piura/INS4_288/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.571	92.165	1	**D21G**
A/Piura/INS4_294/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	96.983	100	7	**K21R**, **A22K**, **E23N**, **V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Piura/INS4_294/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**
A/Piura/INS4_888/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.413	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Piura/INS4_888/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	97.727	90.722	2	**E16G**, **D21G**
A/Puno/INS6_006/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	98.268	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Puno/INS6_006/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	97.727	90.722	2	**E14G**, **D21G**
A/Tumbes/INS4_860/2016	M1 A/California/07/2009(H1N1)	96.137	100	4	**V80I**, **M192V**, **Q208K**, **K230R**
A/Tumbes/INS4_860/2016	M2 A/California/07/2009(H1N1)	98.864	90.722	1	**D21G**

En el segmento NS se identificaron variaciones en los dos genes que comprenden este segmento, en el gen NS1 se identificaron 8 variaciones en todos los aislados peruanos: D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I y N205S; en el gen NS2 se identificaron 3 variaciones en común en todos los aislados peruanos: N29S, T48A y M83I (Tabla 17).

TABLA 17. Sustitución de aminoácidos del segmento NS en el virus influenza A(H1N1)pdm09 de aislamientos peruanos durante los años 2015 – 2016.

AISLADO	GEN	% Identidad AA	% covertura	# mutaciones	Lista de Mutaciones
A/Ancash/INS4_421/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Ancash/INS4_421/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Arequipa/INS5_081/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Arequipa/INS5_081/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Arequipa/INS5_881/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Arequipa/INS5_881/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	96.46	93.388	4	N29S, T48A, M83I, A89T
A/Arequipa/INS6_868/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	95.89	100	9	D2E, D53N, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, N176I, N205S
A/Arequipa/INS6_868/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	96.46	93.388	4	M19L, N29S, T48A, M83I
A/Arequipa/INS6_950/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Arequipa/INS6_950/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Arequipa/INS8_499/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Arequipa/INS8_499/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Cusco/INS5_825/2015	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.804	100	10	D2E, R21Q, E55K, T56K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Cusco/INS5_825/2015	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	98.23	93.388	2	N29S, T48A, M83I
A/La_Libertad/INS5_380/2015	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	95.89	100	12	D2E, E55K, T56K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, G189D, E196K, I198L, N205S
A/La_Libertad/INS5_380/2015	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Lambayeque/INS5_514/2015	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	97.26	100	12	D2E, E55K, T56K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, G189D, E196K, I198L, N205S
A/Lambayeque/INS5_514/2015	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	98.23	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Lambayeque/INS5_790/2015	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.804	100	10	D2E, R21Q, E55K, T56K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Lambayeque/INS5_790/2015	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	98.23	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Lima/INS3_701/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	95.89	100	9	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S, E217D
A/Lima/INS3_701/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	96.46	93.388	4	N29S, T48A, S60I, M83I
A/Lima/INS4_403/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Lima/INS4_403/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Lima/LIMAM16_372/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.804	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Lima/LIMAM16_372/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	96.46	93.388	4	N29S, T48A, M83I, A89T
A/Loreto/INS5_168/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Loreto/INS5_168/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Pasco/INS6_335/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Pasco/INS6_335/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Piura/INS4_288/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Piura/INS4_288/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Piura/INS4_294/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.804	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Piura/INS4_294/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Piura/INS4_888/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.804	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Piura/INS4_888/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I
A/Puno/INS6_006/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.347	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Puno/INS6_006/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	96.46	93.388	4	N29S, T48A, L79V, M83I
A/Tumbes/INS4_860/2016	NS1 A/California/07/2009(H1N1)	96.804	100	8	D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I, N205S
A/Tumbes/INS4_860/2016	NS2 A/California/07/2009(H1N1)	97.345	93.388	3	N29S, T48A, M83I

Todos los segmentos genéticos de los aislamientos peruanos fueron comparados con la cepa vacunal A/California/07/2009. Los resultados obtenidos mostraron cambios aminoácidicos en todos los segmentos del genoma. El gen de la hemaglutinina (HA) muestra la mutación K179N y K180Q en el sitio antigénico Sa del gen HA1, la sustitución S220T se encuentra dentro del sitio antigénico Ca1 del gen HA1, S202T esta localizada en el sitio antigénico Sb de HA1; además muestra sitios antigénicos conservados en comparación con la cepa vacunal A/California/07/2009 en las posiciones 53 (KHNGKLCKL), 157 (GAKSFYKNL), 160 (SFYKNLIWL), 395 (KVNSVIEKM) 437 TYNAELLVL (Saxena *et al.*, 2010). Los sitios de N-glicosilación en las posiciones 27, 28, 40, 104, 293, 304, 498 y 557 (Liu *et al.*, 2019) se encuentran conservadas en todos los aislados peruanos, la variación S179N presenta un sitio de N-glicosilación.

El gen de la neuraminidasa (NA) muestra sus sitios antigénicos conservados en comparación con la cepa vacunal A/California/07/2009 en las posiciones 100 (YSKDNSVRI), 183 (ACHDGINWL), 250 (QASYKIFRI), 298 (GSNRPWVSF) y 418 (IRPCFWVEL) (Saxena *et al.*, 2010), los sitios de N-glicosilación en las posiciones 50, 58, 63, 88, 146 y 235 (Liu *et al.*, 2019), también se encuentran conservados, sin embargo la posición 386 caracterizada por ser un sitio de N-glicosilación muestra una variación aminoacídica de asparagina a lisina perdiendo un sitio de N-glicosilación. En relación a la resistencia a oseltamivir (H275Y) todos los aislados peruanos analizadas se encuentran sensibles al fármaco inhibidor de la neuraminidasa.

Se encontró mutaciones asociadas a la resistencia de amadantinos en la membrana del gen de la Matriz S31N.

El análisis de los resultados permitio determinar que las cepas de virus influenza A(H1N1)pdm09 que cirucularon en el Perú durante los años 2015 y 2016 estan asociadas a la cepa vacuna A/California/07/2009, agrupándose en el clado 6B y 6B.1. Los cambios aminoacídicos identificados en este estudio fueron similares a los encontrados por otros autores.

5.2.5. Análisis estructural *in silico* la proteína Hemaglutinina y Neuraminidasa de los aislamientos de influenza circulantes en el 2015-2016

El análisis estructural de las proteínas Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) fueron realizados a partir de la traducción nucleotidica usando el programa translate ExPasy (Anexo 4 y 5), la predicción de la estructura de la proteína se realizó usando el servidor RaptorX y la estructura terciaria fue validada por el programa molprobity evaluando el Test de Ramachandram.

a. Análisis estructural de Hemaglutinina

Los modelos obtenidos de HA presentan los dominios caracteristicos para esta proteína como: la cabeza o cuerpo de la proteína (conformado por estructuras hojas β plegada del dominio HA1 y α hélice del dominio HA2), y el cuello (conformado por estructuras α hélice y coil). Los modelos de las estructuras proteícas de la HA de los aislados peruanos presentaron un índice de Ramachandram que están entre 97,7% a 99,1%, indicando el porcentaje de aminocidos cuyos angulos diedros de sus residuos están en una región permitida (Tabla 18). En la Figura 31 se puede observar el gráfico de Ramachandram del mejor modelo del aislado peruano A/Arequipa/INS5_081/2016, con un índice de Ramachamdram de 99,1% (94,4% se encuentran en la región favorecida) y 0,9% de aminoacidos con ángulos de los residuos en la región no permitida o atípicos.

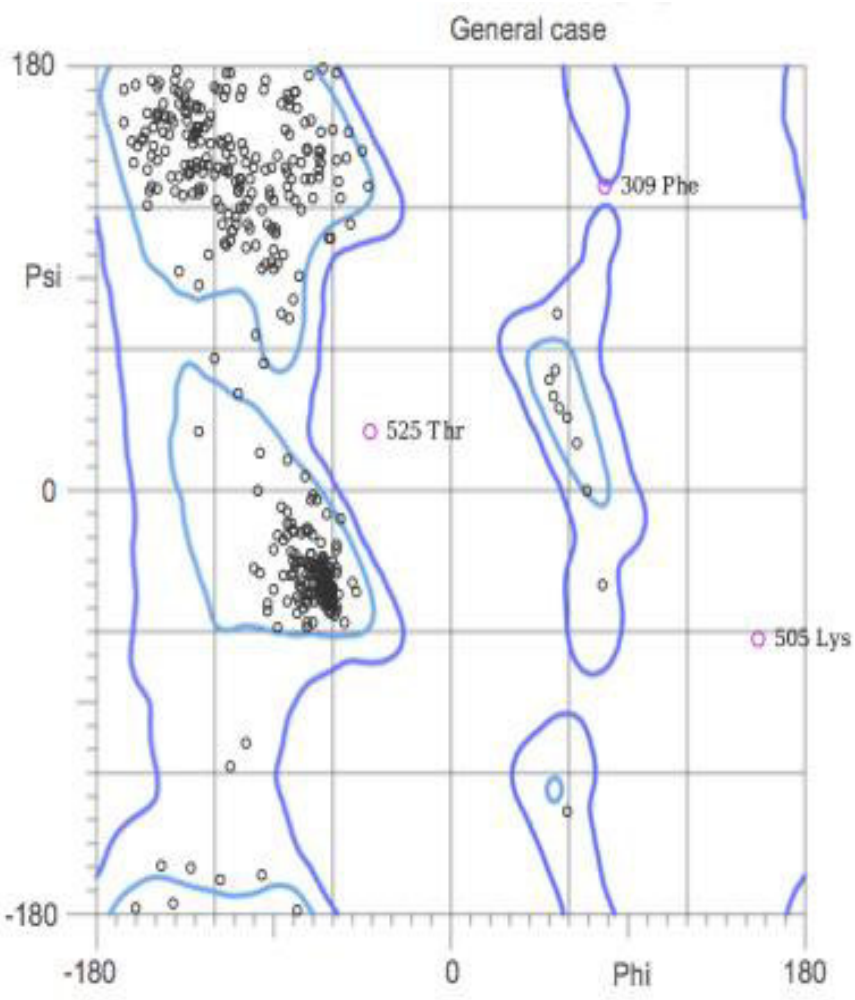


Figura 31. Gráfico de Ramachamdram del modelo de la proteína Hemaglutinina del aislado A/Arequipa/INS5_081/2016.

En la Figura 32 se muestra una comparación de los modelos tridimensionales de HA de la cepa vacunal A/California/07/2009 y del aislado peruano A/Arequipa/INS5_081/2016 resaltándose las posiciones de los cambios aminoacídicos. No se aprecia variaciones estructurales significativas entre los modelos analizados.

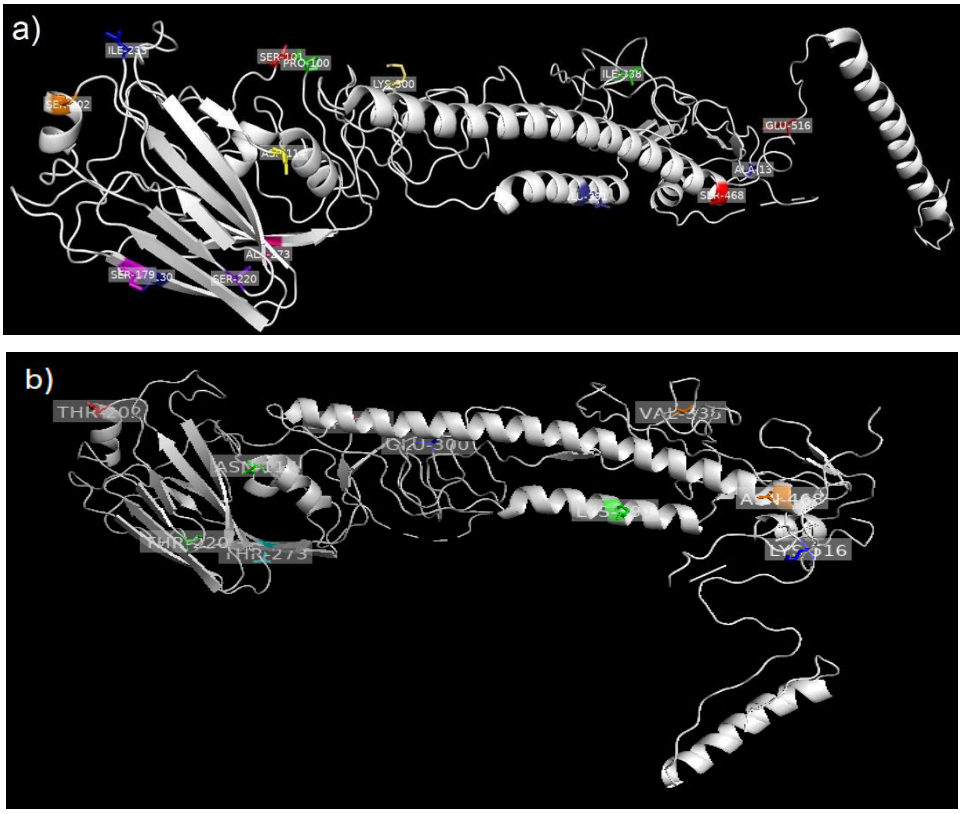
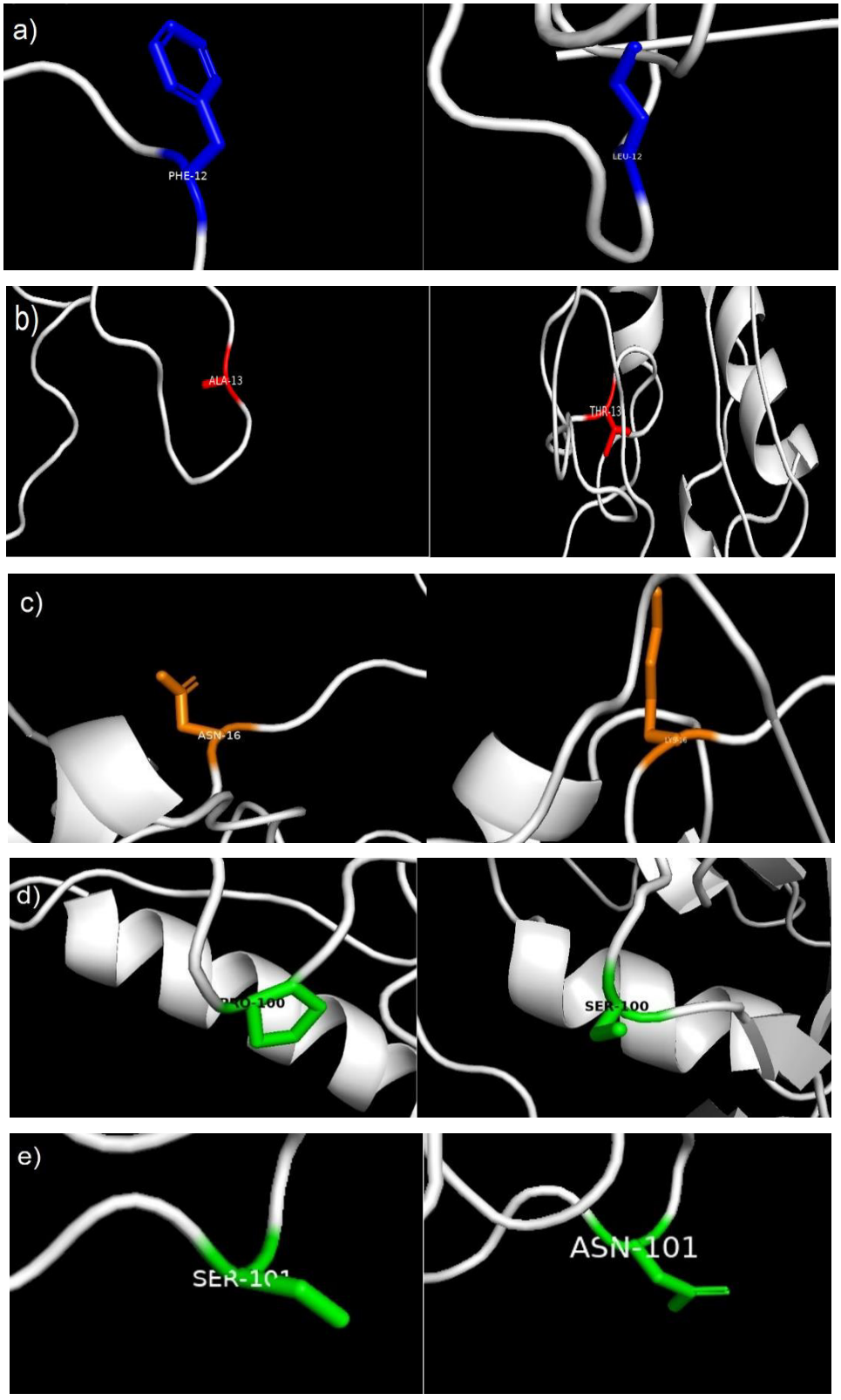
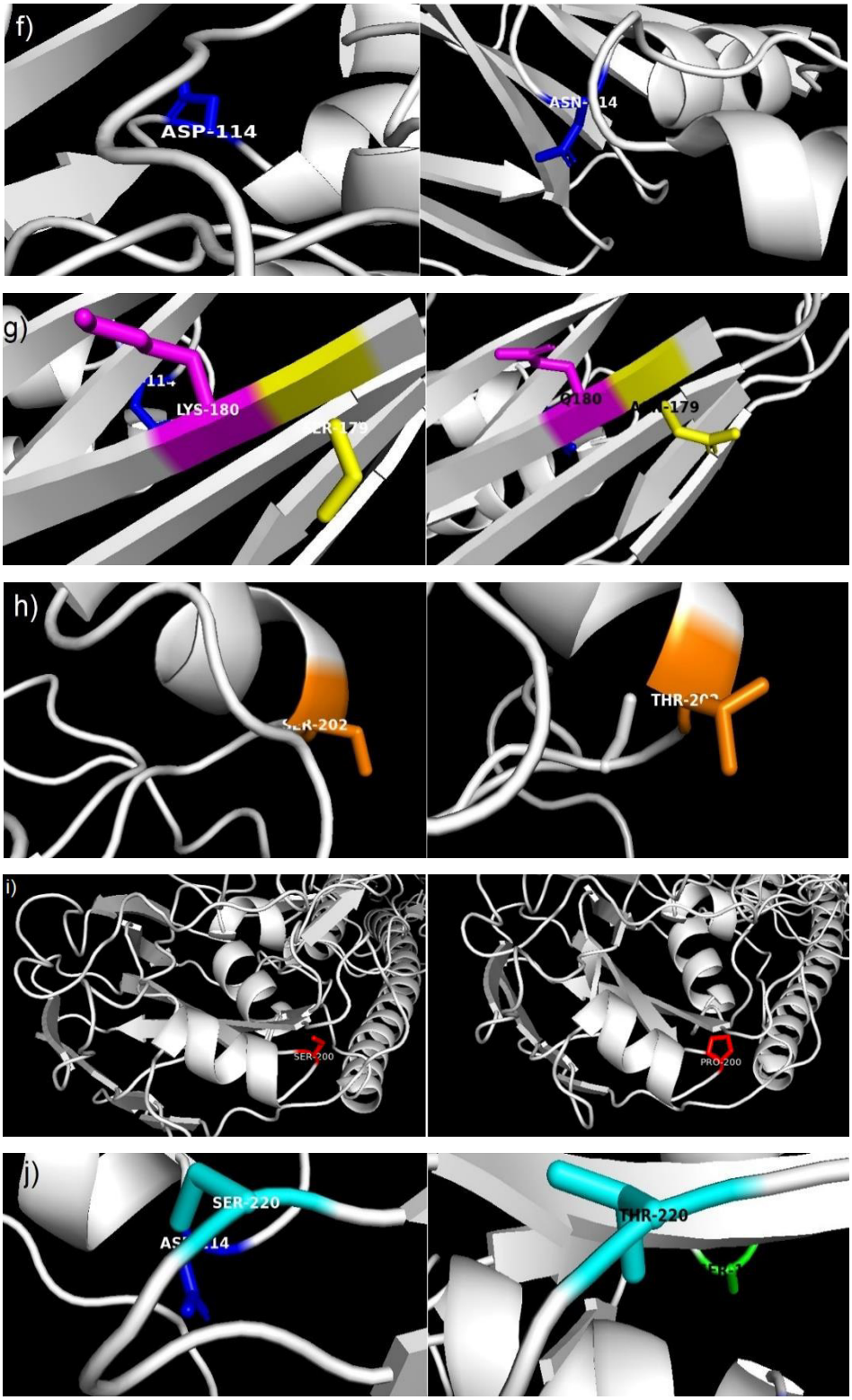
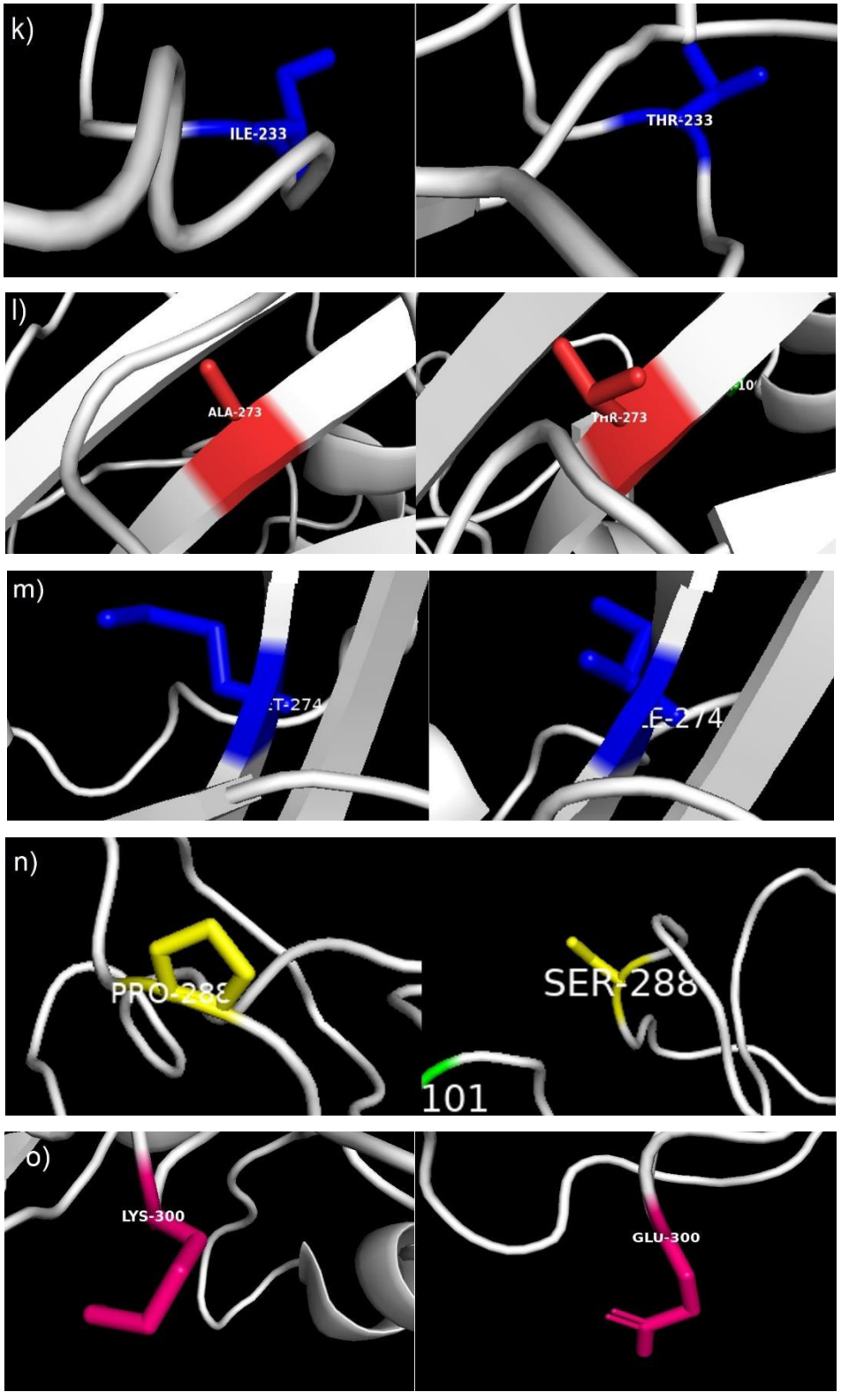


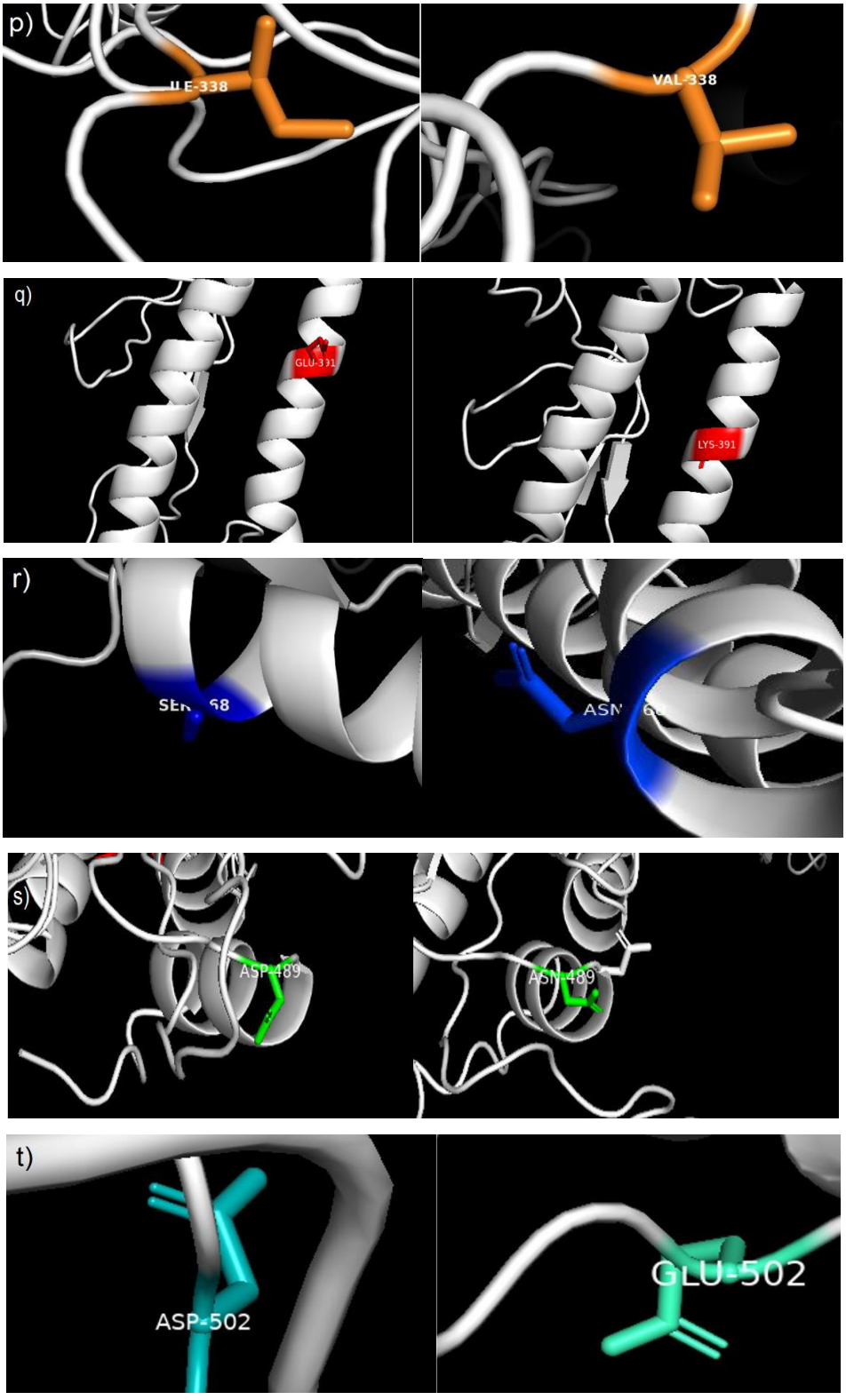
Figura 32. Comparación de modelos de la proteína HA. En a) se muestra el modelo de la cepa vacunal A/California/07/2009. En b) se muestra el mejor modelo obtenido perteneciente al aislado peruano A/Arequipa/INS5_081/2016. Las variaciones son resaltadas en diferentes colores.

En la Figura 33 se muestra todas las variaciones aminoacídicas de los aislados peruanos (lado izquierdo de la figura) en comparación con la cepa vacunal A/California/07/2009 (lado derecho de la figura), en a) F12L, b) A13T, c) N16K, d) P100S, e) S101N f) D114N, g) S179N / K180Q, h) S202T, i) S200P, j) S220T, k) I233T, l) A273T, m) M274I, n) P288S, o) K300E, p) I338V, q) E391K, r) S468N, s) D489N, t) D502E, y u) E516K; en los gráficos resaltamos los radicales R de cada variante aminoacídica. Las variaciones aminoacídicas en los modelos HA de los aislados peruanos no generan variaciones estructurales significativas.


a)
PHE-12
LEU-12
b)
ALA-13
THR-13
c)
ASN-16
d)
SER-100
e)
ASN-101


f)
ASP-114
g)
LYS-180
h)
i)
SER-200
PRO-200
j)
SER-220
THR-220


k)
ILE-233
THR-233
l)
ALA-273
THR-273
m)
n)
PRO-288
SER-288
101
o)
LYS-300
GLU-300


p)
VAL-338
q)
GLU-391
LYS-391
r)
s)
ASP-489
t)
ASP-502
GLU-502

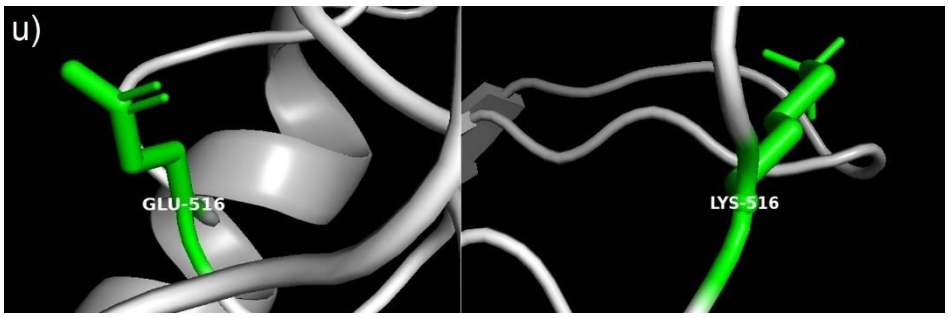


Figura 33. Detalle de la estructura tridimensional de las mutaciones de la proteína HA de los aislados peruanos. Mutaciones presentes en los aislados peruanos (a-u) en el lado izquierdo se muestra el modelo de la cepa vacunal A/California/07/2009, en el lado derecho las mutaciones presentes en los aislados peruanos.

Para comparar las estructuras de HA de los aislados peruanos con respecto a la cepa referencial se utilizó el análisis de la desviación de la raíz media cuadrada de la distancia posicional entre átomos (RMSD, siglas en inglés) con el programa PyMol; respecto a la cepa vacunal A/California/07/2009 el valor RMSD de los modelos esta entre 0,230-2,328 y con la cepa vacunal A/Michigan/45/2015 entre 0-1,665 (Tabla 18). Estos resultados indican que existe una mínima variación en la estructura tridimensional de los modelos de HA cuando son comparadas con ambas HA de las cepas vacunales.

Tabla 18. Índice de Ramachandram y RDMS de los modelos de la proteína Hemaglutinina

CEPA/AISLADO PERUANO	Indice de Ramachandram			RDMS	
	Nº Residuos en la región conservadora	Nº Residuos en la región permitida	Nº Residuos en la región de valores atípicos	A/California/07/2009	A/Michigan/45/2015
A/Michigan/45/2015	92,9% (520/560)	98,0% (549/560)	2,0% (11/560)	-	-
A/California/07/2009	95,2% (531/560)	99,1% (555/560)	0,9% (5/560)	-	-
A/Ancash/INS4_421/2016	94,3% (526/560)	98,9% (553/560)	1,25% (7/560)	0,379	1,551
A/Arequipa/INS5_081/2016	94,4% (529/560)	99,1% (555/560)	0,9% (5/560)	0,393	1,633
A/Arequipa/INS5_881/2016	93,9% (526/560)	98,6% (552/560)	1,43% (8/560)	0,399	1,665
A/Arequipa/INS6_868/2016	93,0% (521/560)	98,0% (549/560)	2,0% (11/560)	1,715	0,000
A/Cusco/INS5_825/2015	94,5% (529/560)	98,6% (552/560)	1,43% (8/560)	2,328	1,580
A/La_Libertad/INS5_380/2015	94,6% (529/560)	99,1% (554/560)	1,0% (6/560)	2,237	1,565
A/Lambayeque/INS5_514/2015	95,0% (532/560)	99,3% (556/560)	0,7% (4/560)	2,203	1,600
A/Lambayeque/INS5_790/2015	93,9% (526/560)	98,6% (552/560)	1,43% (8/560)	0,230	1,521
A/Lima/INS3_701/2016	94,1% (527/560)	99,1% (554/560)	1,0% (6/560)	2,200	1,617
A/Lima/INS4_403/2016	93,4% (523/560)	98,0% (549/560)	2,0% (11/560)	1,538	0,000
A/Lima/LIMAM16_372/2016	92,9% (520/560)	98,2% (550/560)	1,8% (10/560)	1,527	0,146
A/Loreto/INS5_168/2016	94,6% (529/560)	98,7% (553/560)	1,25% (7/560)	0,400	1,715
A/Pasco/INS6_335/2016	93,2% (522/560)	98,2% (550/560)	1,8% (10/560)	1,512	0,150
A/Piura/INS4_288/2016	93,2% (522/558)	98,0% (549/560)	2,0% (11/560)	1,538	0,000
A/Piura/INS4_294/2016	92,9% (520/560)	97,7% (547/560)	2,3% (13/560)	1,588	0,000
A/Piura/INS4_888/2016	92,7% (519/560)	97,7% (547/560)	2,3% (13/560)	1,538	0,000
A/Puno/INS6_006/2016	93,0% (521/560)	98,4% (552/560)	1,43% (8/560)	0,358	1,541
A/Tumbes/INS4_860/2016	93,2% (522/560)	98,0% (549/560)	2,0% (11/560)	1,538	0,000
A/Arequipa/INS6_950/2016	93,9% (526/560)	98,8% (553/560)	1,25% (7/560)	2,215	1,626
A/Arequipa/INS8_499/2016	93,9% (526/560)	98,8% (553/560)	1,25% (7/560)	2,255	1,604

b. **Análisis estructural de Neuraminidasa**

Los modelos de la estructura proteíca de la Neuraminidasa de los aislados peruanos tienen un índice de Ramachandram entre 98,1% a 99,1% (Tabla 19). En la figura 34 se puede observar el gráfico de Ramachandram del mejor modelo de NA perteneciente al aislado peruano A/Lambayeque/INS5_790/2015 con un índice de Ramachandram de 99,1% (94,6% de los residuos se encuentran en la región favorecida) y 0,9 % de aminoacidos que presentan residuos en una región no permitida o atípicos.

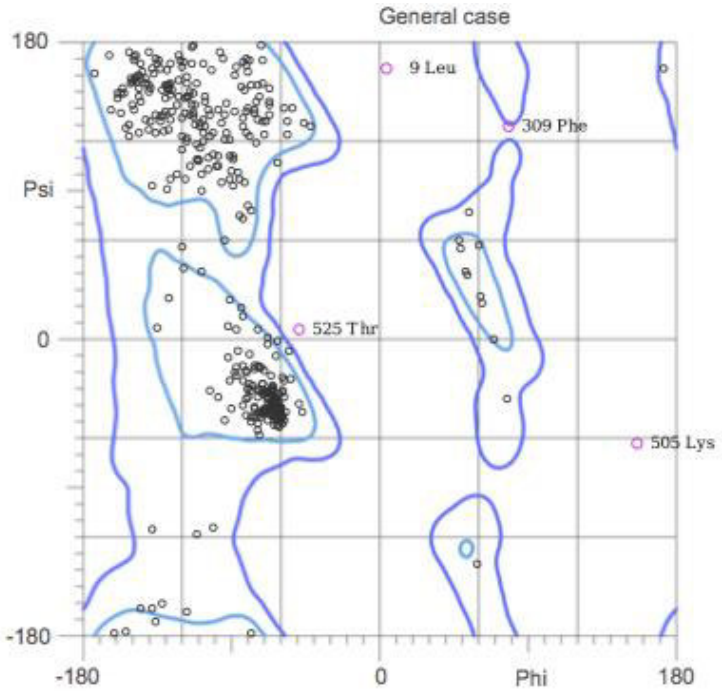


Figura 34. Grafico de Ramachamdram del modelo de la proteína Neuraminidasa del aislado peruano A/Lambayeque/INS5_790/2015.

En la figura 35 se muestra la comparación del modelo de la proteína NA de la cepa vacunal A/California/07/2009 y el mejor modelo de NA del aislado peruano A/Lambayeque/INS5_790/2015, resaltando en diferentes colores la posición de los cambios aminoacídicos encontradas con el aislado peruano.

La estructura tridimensional de la proteína Neuraminidasa se caracteriza por tener un dominio tipo poro o canal, las variaciones presentes en los aislados peruanos se distribuyen a lo largo de la secuencia aminoacídica. La comparación de las estructuras indica que no hay variación en los dominios debido a las mutaciones presentes.

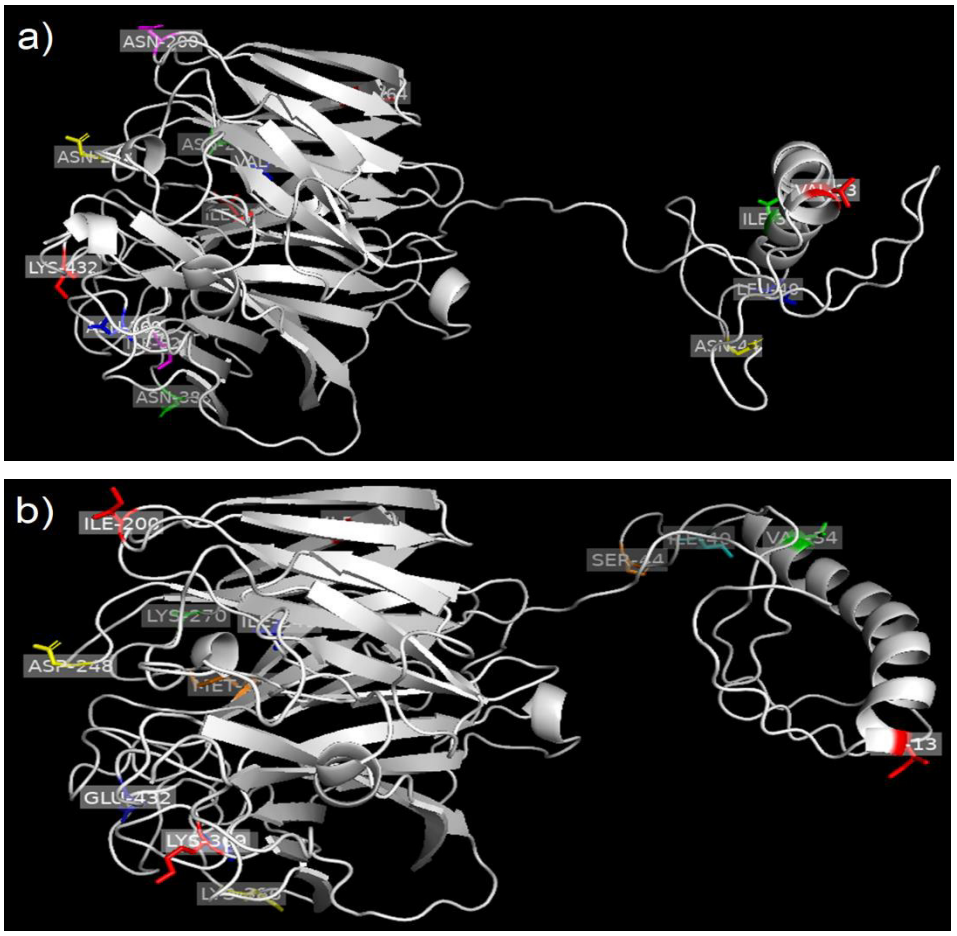
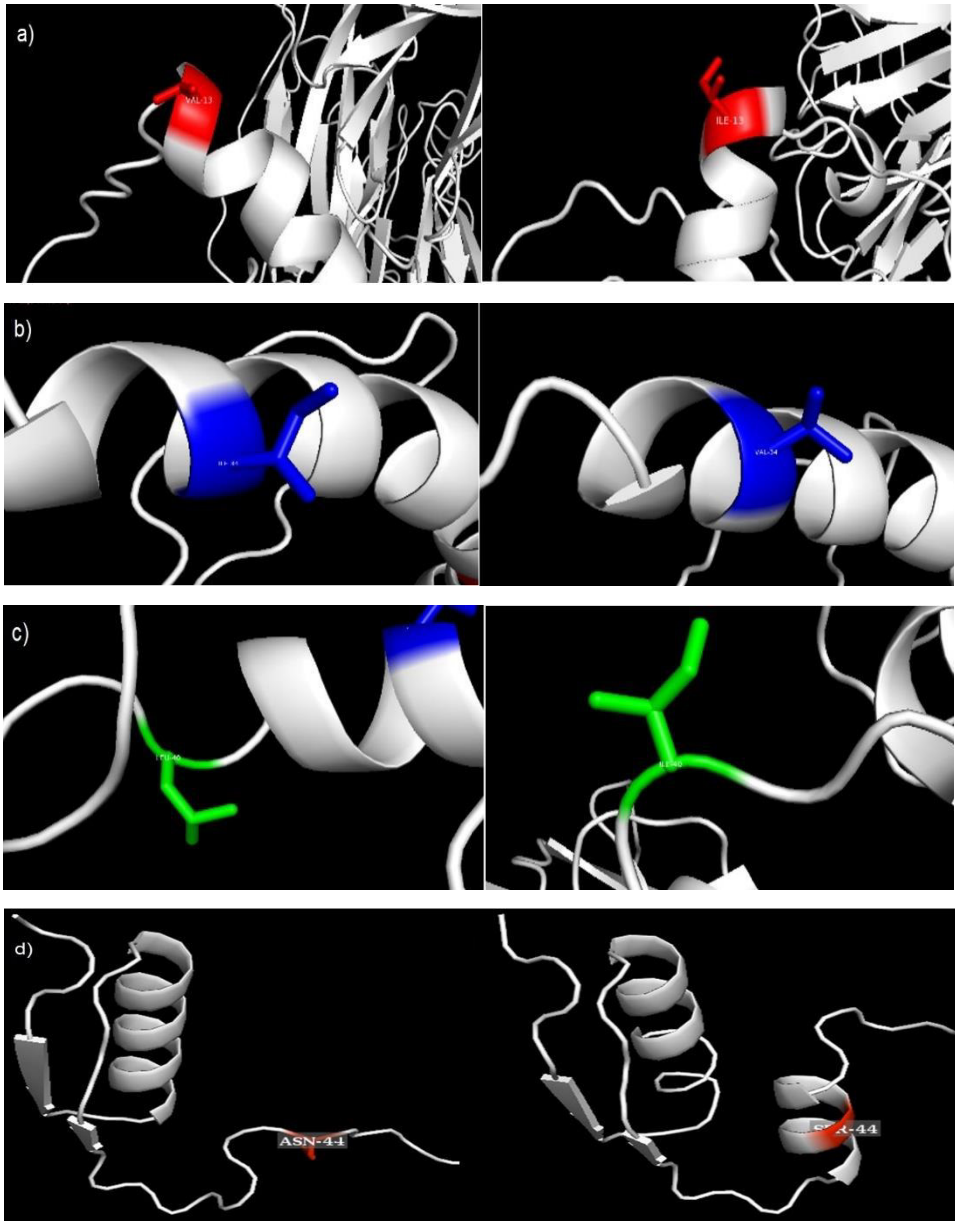
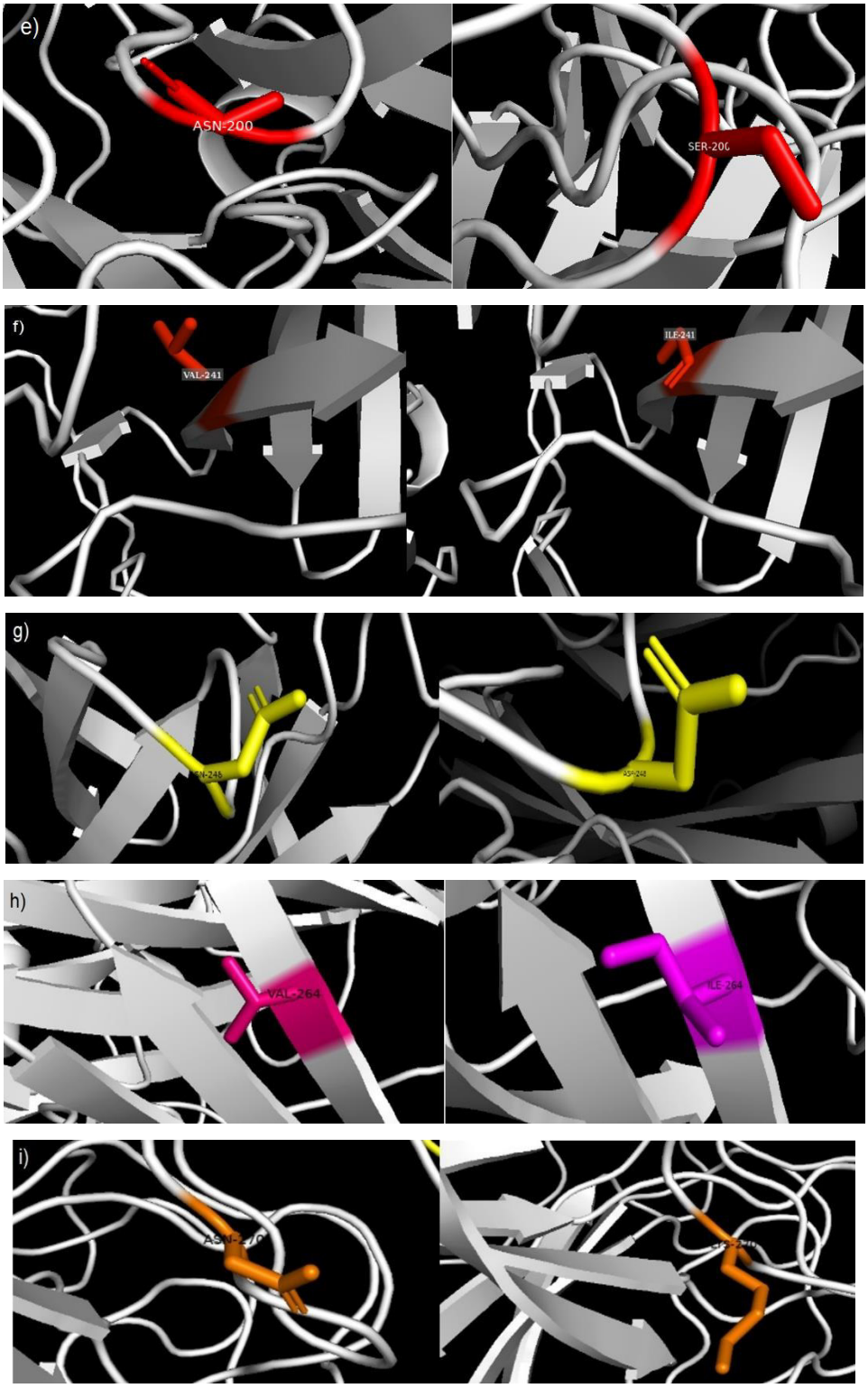


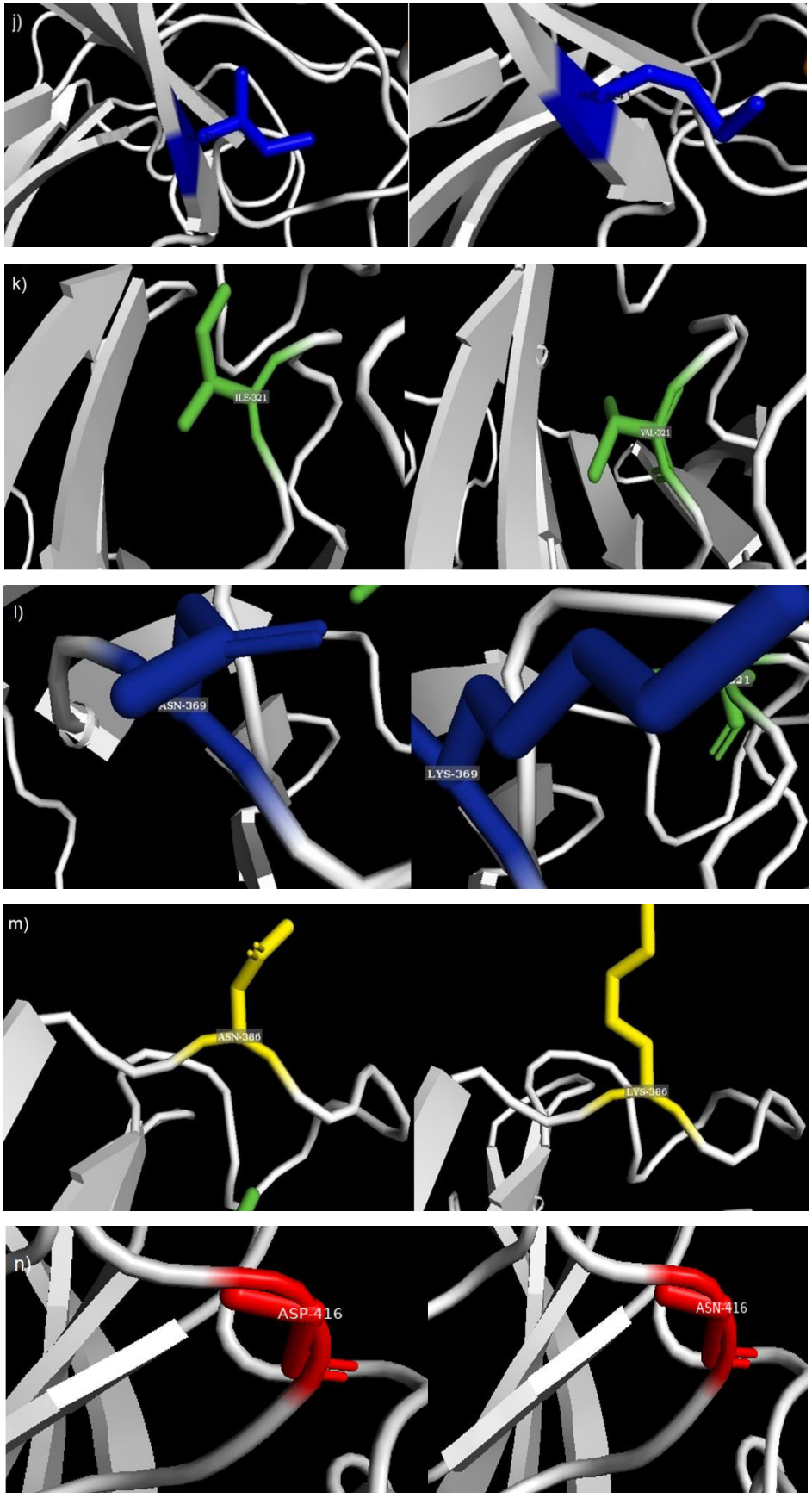
Figura 35. Comparación de los modelos de la proteína NA. En a) se muestra el modelo de NA de la cepa vacunal A/California/07/2009. En b) se muestra el modelo del aislado peruano A/Lambayeque/INS5_790/2015. Las mutaciones son resaltadas en diferentes colores.

En la Figura 36 se muestra todas las variaciones aminoacídicas de NA de los aislados peruanos (lado izquierdo de la figura) en comparación con NA de la cepa

vacunal A/California/07/2009 (lado derecho de la figura), en a) V13I, b) I34V, c) L40I, d) N44S, e) N200S f) V241I, g) N248D, h) V264I i) N270K, j) I314M, k) I321V, l) N369K, m) N386K, n) D416N, o) K432E, p) I365T, q) I117M y r) D199N; en los gráficos resaltamos los radicales R de cada variante aminoacídica.




e)
ASN-200
SER-206
f)
VAL-241
ILE-241
g)
ASN-248
h)
VAL-264
ILE-264
i)


j)
k)
ILE-321
VAL-321
l)
ASN-369
LYS-369
m)
ASN-386
LYS-386
n)
ASP-416
ASN-416

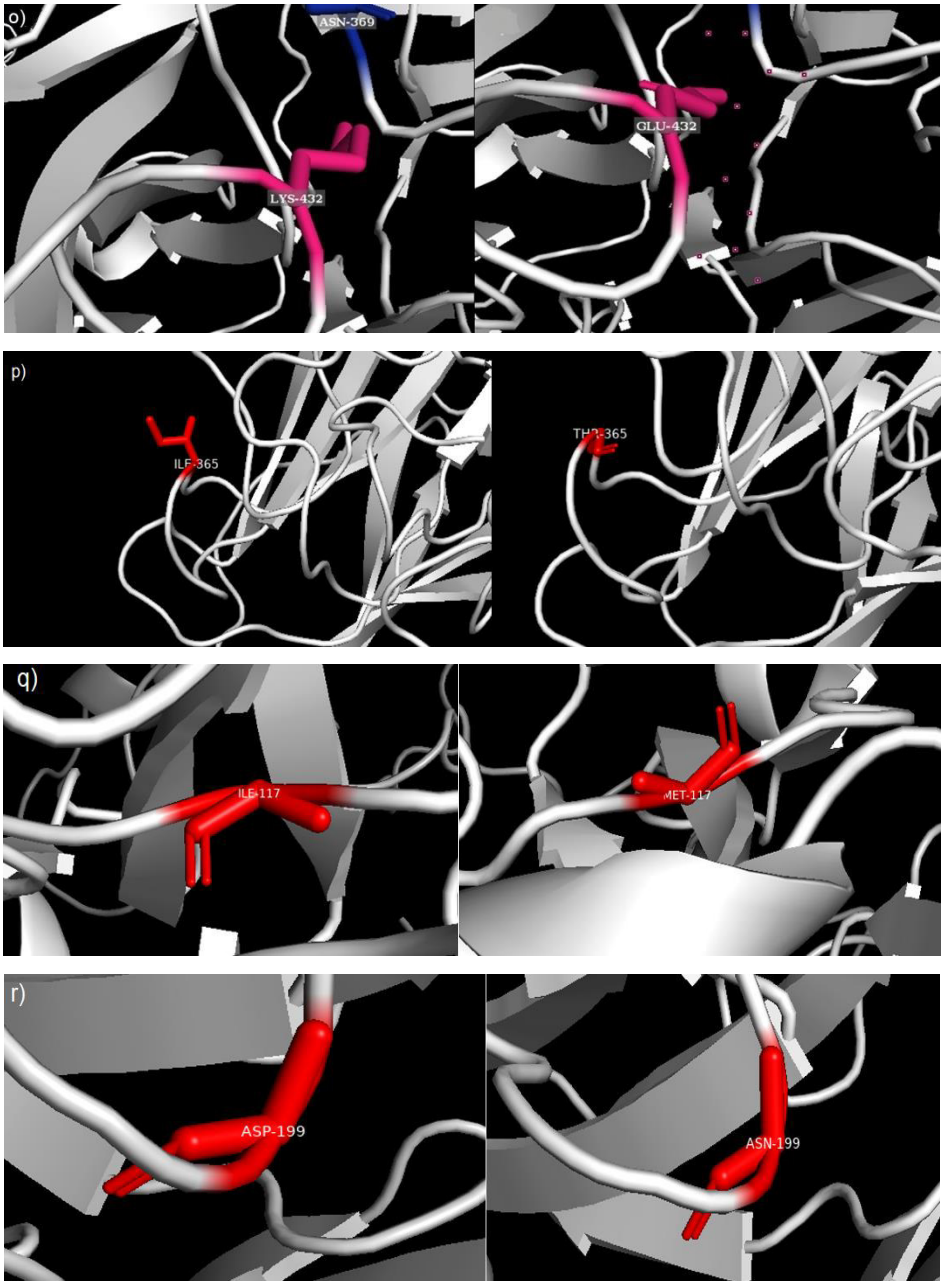


Figura 36. Detalle de la estructura tridimensional de las mutaciones de la proteína Neuraminidasa de los aislados peruanos. Mutaciones presentes en los aislados peruanos (a-r) en el lado izquierdo se muestra el modelo de la cepa vacunal A/California/07/2009, en el lado derecho las mutaciones presentes en los aislados peruanos.

El análisis estructural de las variantes aminoacídicas de NA en comparación con NA de la cepa vacunal A/California/07/2009 muestra que no existe variacion estructural debido al cambio aminoacídico en los aislados peruanos.

Para comparar las estructuras de NA los aislados peruanos con respecto a la cepa referencial utilizó el análisis de la desviación de la raíz media cuadrada de la distancia posicional entre átomos (RMSD, siglas en inglés) con el programa PyMol; respecto a la cepa vacunal A/California/07/2009 se obtuvo un valor RMSD entre 0,114-0,637 y con la cepa vacunal A/Michigan/45/2015 un valor de RMSD entre 0,001-0,567 (Tabla 19). Estos resultados indican que existe una mínima variación en la estructura tridimensional de los modelos de NA de los aislados en comparación con ambas vacunas.

Tabla 19. Índice de Ramachandram y RDMS de los modelos de la proteína Neuraminisada

CEPA/AISLADO PERUANO	Indice de Ramachandram			RDMS	
	Nº Residuos en la región conservadora	Nº Residuos en la región permitida	Nº Residuos en la región de valores atípicos	A/California/07/2009	A/Michigan/45/2015
A/Michigan/45/2015	93,4% (436/467)	98,1% (458/467)	1,93% (9/467)	-	-
A/California/07/2009	92,7% (433/467)	98,5% (460/467)	1,5% (7/467)	-	-
A/Ancash/INS4_421/2016	93,6% (437/467)	98,3% (459/467)	1,7% (8/467)	0,235	0,245
A/Arequipa/INS5_081/2016	93,1% (435/467)	98,1% (458/467)	1,93% (9/467)	0,154	0,162
A/Arequipa/INS5_881/2016	93,8% (438/467)	98,9% (462/467)	1,1% (5/467)	0,146	0,165
A/Arequipa/INS6_868/2016	93,8% (438/467)	98,3% (459/467)	1,7% (8/467)	0,156	0,188
A/Cusco/INS5_825/2015	92,5% (432/467)	98,1% (458/467)	1,93% (9/467)	0,185	0,164
A/La_Libertad/INS5_380/2015	93,8% (438/467)	98,5% (460/467)	1,5% (7/467)	0,114	0,165
A/Lambayeque/INS5_514/2015	93,6% (437/467)	98,5% (460/467)	1,5% (7/467)	0,155	0,166
A/Lambayeque/INS5_790/2015	94,6% (442/467)	99,1% (463/467)	0,9% (4/467)	0,131	0,161
A/Lima/INS3_701/2016	94,0% (439/467)	98,9% (462/467)	1,1% (5/467)	0,160	0,282
A/Lima/INS4_403/2016	94,0% (439/467)	98,7% (461/467)	1,3% (6/467)	0,154	0,170
A/Lima/LIMAM16_372/2016	92,9% (434/467)	98,5% (460/467)	1,5% (7/467)	0,192	0,145
A/Loreto/INS5_168/2016	93,6% (437/467)	98,7% (461/467)	1,3% (6/467)	0,259	0,188
A/Pasco/INS6_335/2016	93,8% (438/467)	98,7% (461/467)	1,3% (6/467)	0,637	0,268
A/Piura/INS4_288/2016	93,1% (435/467)	98,9% (462/467)	1,1% (5/467)	0,170	0,178
A/Piura/INS4_294/2016	94,4% (441/467)	98,9% (462/467)	1,1% (5/467)	0,190	0,001
A/Piura/INS4_888/2016	93,1% (435/467)	98,9% (462/467)	1,1% (5/467)	0,159	0,001
A/Puno/INS6_006/2016	93,6% (437/467)	98,3% (459/467)	1,7% (8/467)	0,146	0,161
A/Tumbes/INS4_860/2016	94,2% (440/467)	98,3% (459/467)	1,7% (8/467)	0,157	0,001
A/Arequipa/INS6_950/2016	94,2% (440/467)	98,3% (459/467)	1,7% (8/467)	0,147	0,567
A/Arequipa/INS8_499/2016	93,8% (438/467)	98,7% (461/467)	1,3% (6/467)	0,150	0,001

VI. DISCUSIÓN

6.1. High Resolution Melting

En el presente estudio se analizó muestras positivas a influenza A(H1N1)pdm09 durante el periodo 2015 y 2016, se aplicó el método HRM para caracterizar genotipos de influenza A(H1N1)pdm09 pudiendo identificar 10 genotipos distribuidos en todo el territorio peruano. Asimismo, se determinó que algunos genotipos están asociados a características clínicas y a algunos grupos etarios.

Nuestros resultados reflejan la prevalencia de los casos de influenza A(H1N1)pdm09 en el 2015 y 2016 (Suárez, 2018) dado que nuestro muestreo fue proporcional; por ello, a los departamentos con mayor prevalencia de A(H1N1)pdm09 (Piura, Lima y Arequipa) corresponden a un mayor número de muestras incluidas en el estudio (Figura 2). En el año 2016 se presentó un incremento de casos debido a la ocurrencia de un brote en Arequipa (MINSA, 2016).

La técnica de HRM consiste en desnaturalizar fragmentos de ADN en un rango controlado de temperaturas en presencia de una molecula intercalante que emite una señal de flourescencia cuando interacciona con el ADN. Los niveles de fluorescencia son detectados por el sistema óptico del termociclador de PCR en tiempo real y graficadas con respecto a la temperatura generando un perfil o curva de flourescencia que correlaciona con la secuencia de los fragmentos que se están analizando (Tong y Giffard, 2012). HRM ha demostrado ser una técnica flexible, rápida, eficiente y de bajo costo frente a otros métodos moleculares, siendo aplicado para detectar diversos patogenos; a pesar de sus desventajas en el grado de discriminación en comparación con la secuenciación, esta técnica suele ser usada por sus grandes bondades para el manejo de un mayor número de muestras aplicadas a estudios de epidemiología molecular.

Este método ha sido aplicado para la detección de genotipos de adenovirus en muestras ambientales (Hartmann *et al.*, 2013), en la detección de genotipos del virus de la bronquitis infecciosa en pollos (Masoudian *et al.,* 2018), en la identificación de especies, genotipado de especies microbianas y variantes genotípicas que conducen a la resistencia (Tong *et al.*, 2012), en la detección de variantes resistentes de HBV a lamivudina, adefovir y entecavir (Hsiao *et al.*, 2012). Además, el análisis de HRM se ha aplicado para la identificación de subtipos de influenza A H5 y H7 en aves (Curd *et al.*, 2011), para detectar subtipos influenza H1N1 y H3N2 (Lin *et al.*, 2008), para caracterizar aislamientos recombinantes de influenza A/H5N1 (Kalthoff *et al.*, 2013), para detectar cambios en el gen de la neuraminidasa en subtipos de Influenza H1N1 pdm09 (Varillas *et al.*, 2011), y para identificar la mutación resistente H275Y a oseltamivir (Chen *et al.*, 2011). Dado a que HRM es un método versátil nosotros lo utilizamos para la identificación de genotipos del subtipo A(H1N1)pdm09, lo cual también fue propuesto anteriormente por Lin *et al.* (2008).

Nuestro estudio pudo identificar diferentes perfiles de HRM, 4 perfiles para el gen de la hemaglutinina (A, B, C, D) y 3 para el gen de la matriz (a, b, c) (Figura 5 y 6); este resultado es concordante con el hecho de que la tasa de mutación de HA (0,7-2,6%) es mayor en comparación con el gen M (0-0,6%) (Lin *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013).

Para la obtención de los genotipos usando los dos marcadores (HA y M) se hizo todas las combinaciones posibles de ambos genes encontrado 10 genotipos que engloban los aislamientos durante el año 2015 y 2016, siendo los genotipos más frecuentes de forma descendente I, II, VIII, IV, VI, VII, IX, V, III y X (Figura 9). Siendo Piura, Arequipa y Lima los departamentos con mayor divergencia de genotipos; siendo los genotipos I y II que provienen de la combinación de los genotipos del gen de la hemaglutinina y de la matriz (A-A) y (A-B) respectivamente, los mas predominantes en todo el país.

Nuestros resultados pueden ser utilizados para monitorear los cambios de la distribución de genotipos en el tiempo, de manera similar a otros estudios donde se

detectan genotipos basados en el análisis del genoma completo mediante secuenciación. Asi, en Bangladesh se detectaron 3 genotipos para el H1N1 en aves durante la pandemia del 2009 (Gerloff *et al.*, 2016). Por otro lado, en un estudio del 2009 detectaron 7 genotipos de A(H1N1)pdm09 siendo el genotipo 7 el más prevalente y distribuido en Wisconsin, New York y Asia, no identificando diferencia en la gravedad clínica, edad o aptitud física (Nelson *et al.*, 2009), al igual que en nuestro estudio, nosotros tampoco encontramos asociación entre los genotipos hallados con respecto al sexo de las muestras analizadas; a diferencia de los genotipos I, II, IV y VIII con el grupo etario de 18-60 años, la complicación de los pacientes (ETI, IRAG, IRAG INUSITADO) con los genotipos I, II y VIII que si existe asociación estadísticamente significativa.

En el presente estudio el uso de HRM permitió analizar un mayor número de muestras en comparación con estudios anteriores (García *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2014), lo que permitió obtener datos más robustos sobre la distribución de los genotipos más frecuentes que circulan en el Perú.

6.2. Secuenciamiento del genoma completo

Nosotros realizamos el secuenciamiento de nueva generación del genoma completo de influenza A(H1N1)pdm09, para esto amplificamos el genoma completo del virus influenza usando la metodología propuesta por Zhou *et al.* (2009), donde se optimiza la amplificación del genoma del virus influenza en una sola reacción aprovechando las características de conservación de los extremos 3´ y 5´ de los 8 segmentos del virus influenza. El uso de esta metodología acorta los tiempos de amplificación de los segmentos tal como se venía realizando en los protocolos de amplificación de los segmentos por partes que requiere varias reacciones de amplificación para obtener el genoma completo (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team; 2009).

Sin embargo, es importante tener encuenta que el éxito de la amplificación del genoma completo está ligado a la calidad de la muestra (adecuada conservación de la muestra) y la concentración del agente infeccioso en la muestra como se ha observado en estudios previos (Takayama *et al.*, 2021; Van Poelvoorde *et al*., 2021; Nabakoosa *et al*., 2022).

Asimimo, el secuenciamiento del genoma completo de influenza por NGS presenta la ventaja sobre el secuenciamiento de un fragmento del genoma de influenza (ya sea HA, NA o Matriz) mediante Sanger debido a que se obtendría mayor información de todo el genoma del virus y asi mismo se podría detectar posibles recombinaciones o reacomodamiento de fragmentos en los aislamientos a ser analizados, como los detectados previamente en África (Nabakooza *et al*., 2022) y Bélgica (Van Poelvoorde *et al*., 2021).

Sin embargo, una desventaja del método NGS utilizado frente al método de Sanger es que la metodología requiere insumos costosos, equipamiento, personal entrenado en esta nueva metodología y mayores recursos computacionales (Quiñones-Mateu *et al*., 2014, Lee *et al*., 2020).

Por otro lado, la metodología para la amplificación y posterior secuenciamiento utilizada en la presente investigación puede ser aplicada a otros subtipos de influenza A como H3N2, H5, H7 y otros que pudiera ser de interés en salud pública (Zhou e*t al.* 2009). Mientras que para poder amplificar influenza B requeriría utilizar un pool de primers adecuado (Zhao et al, 2016).

Así mismo, la metodología utilizada en esta investigación es similar a la planteada en otras investigaciones similares (Mena *et al.,* 2016; Owuor *et al.,* 2019; Lee, 2020; Chao *et al.,* 2021; Takayama *et al.,* 2021). Los datos obtenidos presentan indicadores de calidad adecuados como número de reads obtenidos, número de reads de alta calidad luego de la limpieza de los archivos fastq, coberturas de los reads mayor a 150x lo cual asegura la calidad de los genomas obtenidos.

En nuestro estudio se pudo calcular la fracción del genoma (%) secuenciado en relación al genoma de referencia de los aislamientos es mayor a 90%; sin embargo, se pudo identificar 4 aislados cuya fracción del genoma secuenciado es menor. Es probable este resultado se deba a una baja concentraciones de virus en la muestra, o a la presencia de algún inhibidor en la muestra produzca una amplificación ineficiente. Estos resultados son concordantes con otros estudios que utilizan la misma o similar metodología (Mena *et al.,* 2016; Owuor *et al.,* 2019; Lee, 2020; Chao *et al.,* 2021; Takayama *et al.,* 2021). Sin embargo, se pudo obtener información de los segmentos del genoma luego de la edición manual.

6.3. Filogenia

La técnica de secuenciación masiva permitió la caracterización del genoma completo del virus Influenza A(H1N1)pdm09, permitiendo una vigilancia molecular eficiente. La vigilancia molecular para el virus de influenza A(H1N1)pdm09 se hace necesario debido a que se puede identificar la aparición de nuevas variantes. La secuenciación del genoma completo del virus de influenza proporcionó información más completa del virus, sobretodo como está cambiando y como estas mutaciones afectan la antigenicidad y la resistencia a los antivirales.

La caracterización filogenética esta enfocada en el gen Hemaglutinina, existiendo una clasificación definida en base a la variación aminoacídica y a la acumulación de estas conforme el paso de los años; siendo el clado 7 caracterizado por las variaciones S202T(B), A214T, S160G; el clado 6C representado por las variaciones V251I, M274V, K300E; el clado 6B representado por las mutaciones K180Q, A273T, K300E, E516K; el subclado 6B.1 representado por las variaciones S101N, S179N, I233T y el subclado 6B.2 caracterizado por las mutaciones V169T, V190I, A278S, E508G y D518E (Liu *et al*., 2019). Nosotros encontramos variaciones aminoacídicas en el gen Hemaglutinina en nuestros aislados peruanos caracterizados por las mutaciones S202T, K180Q, A273T, K300E, E516K, S179N y I233T, estas variaciones son representativas del clado 6B y del subclado 6B.1, sin embargo,

encontramos la variación S202T característica del clado 7 según Liu *et al.* (2018) en todas los aislados caracterizados, a pesar de esta variación la mayoría de las mutaciones halladas están en relación con el clado 6B; otra clasificación generada por NIC-FIOCRUZ del 2019 reportan a la mutación S202T como característico del clado 6 (P100S, D114N, S202T, S220T, K300E, E391K y I338V), el clado 6B con las variaciones K180Q, A273T y K300E, y el subclado 6B.1 representado por las variaciones S101N, S179N y I233T; nosotros encontramos todas las variaciones correspondientes al clado 6 y 6B, para el subclado 6B.1 nosotros encontramos las variaciones S179N y I233T en todos los aislados y la variación S101N en la mayoría de los aislados. Ambas clasificaciones tienen en su mayoría relación con las variantes encontradas en nuestro estudio siendo la clasificación reportada por Brazil la mas idónea para la clasificación de aislados del virus Influenza A(H1N1)pdm09 reportados en territorio peruano.

Nosotros hicimos el análisis filogenetico del gen Hemaglutinina (Figura 29) encontrando que nuestros aislados peruanos se encuentran soportados por la vacuna referencial A/California/07/2009 recomendada por la CDC para el año 2015-2016. También hallamos la variante K180Q en todos nuestros aislados peruanos relacionada a una variante de escape, según el estudio de Huang *et al.* (2020) donde evaluaron 3 sueros (anticuerpos) obtenido por la vacunación con A/California/07/2009 frente a una cepa de escape (presenta una variante de escape: K180Q) a la neutralización, encontrando que los anticuerpos no neutralizaban con la cepa de escape asumiendo que la vacuna A/California/07/2009 no era eficaz para estos 3 sueros evaluados, este comportamiento fue similar al comparar una cepa del clado 6B (caracterizado por la variante K180Q) del 2015-2016, por lo tanto la vacuna A/California/07/2009 no era eficaz al 100% para el clado 6B y la variante K180Q esta relacionada al escape de neutralización viral. Nosotros no evaluamos el ensayo de neutralización de Hemaglutinina, sin embargo, nuestro análisis filogenetico indica que nuestros aislados peruanos del 2015-2016 se encuentran relacionados con la cepa vacunal A/California/07/2009, sin embargo, observamos que la cepa vacunal

A/Michigan/45/2015 (2017-2020) tiene una distancia filogenética mas cercana que la cepa vacunal A/California/07/2009.

Nosotros encontramos que la distribución de nuestros aislados estan agrupados en el clado 6B y subclado 6B.1; en nuestro estudio incluimos cepas referenciales reportadas por Hadfield *et al.* (2018) con cepas del 2013 – 2016 referenciales para los clados, obteniendo que muestros aislados peruanos forman clusters definidos relacionados con estas cepas referenciales.

Una clasificación generada con cepas del 2009 en base en secuenciación del genoma completo indica que las cepas de América se encuentras agrupadas en el clado 7, este resultado equivalente a muestras de américa del sur tal como las cepas analizadas por estudios de Baillie *et al.* (2012) y Barrero *et al.* (2011) con muestras de Argentina, Estados Unido, India y Reino Unido donde muestran el predominio de la circulacion del virus en el clado 7. En relación a cepas peruanas en base a la caracterización del genoma completo por Padilla *et al.* en el 2013 encontraron variaciones en S220T (HA), N248D (NA), I123V (NS) y V100I (NP) relacionadas al clado 7. Nosotros encontramos todas las variaciones mencionadas por Padilla *et al.* (2013) en nuestros aislados del 2015 y 2016; sin embargo, nuestro análisis filogenetico indica que los aislados del 2015 y 2016 se encuentran clasificadas en el clado 6B, cabe resaltar que la clasificación realizada por Padilla *et al.* (2013) esta en base a la clasificación propuesta por Nelson *et al.* en el 2009 con cepas de Canada, China, Japon, Alemania, Italia, Luxembourg, Rusia, California, Maryland, Massachusetts, Ohio y Wisconsin para el clado 7 en base a las variaciones aminoacídicas, sin incluir cepas de América del sur.

En tanto, nosotros encontramos que el análisis filogenético del gen hemaglutinina y del genoma completo guardan relación, indicando que ambos análisis clasifican a nuestros aislados peruanos en el clado 6B y subclado 6B.1, por lo que podemos infererir que el análisis del gen Hemaglutinina es representativo para la clasificación de los virus circulantes en territorio peruano.

También se puede observar la agrupación de las cepas peruanas del 2015 en un clado diferentes a las muestras del 2016. Estos resultados indican que existe el ingreso de diferentes genotipos de Influenza A(H1N1)pdm09 en los años 2012, 2013, 2015 y 2016, lo cual nos da ha entender que cada ciclo epidémico es causado por la introducción de un genotipo diferente que predomina.

6.4. Variaciones Aminoacídicas

Nosotros realizamos el análisis de las variaciones aminoacídicas del genoma completo en comparación con la cepa vacunal A/California/07/2009 encontrando que estas variaciones se van acumulando en el tiempo. Nuestros aislados peruanos se caracterizan por la variación frecuentes aminoacídica en PB2 (R54K, M66I, D195N, R293K, R299K, V344M, I354L, S453T y V731I), PB1 (G154D, I397M y I435T), PA (P224S, N321K, I330V, R362K y I545V), PA-X (V100I, N204S, R221Q y L229S), HA (F12L, A13T, N16K, P100S, S101N, D114N, S179N, K180Q, S200P, S202T, S220T, I233T, A273T, M274I, P288S, K300E, I338V, E391K, S468N, D489N, D502E y E516K), NP (V100I y S498N), NA (V13I, I34V, L40I, N44S, I177M, D199N, N200I, V241I, N248D, V264I, N270K, I314M, I321V, I365T, N369K, N386K, D416N y K432E), M1 (V80I, M192V y K230R), M2 (D21V), NS1 (D2E, E55K, L90I, I123V, E125D, K131E, V178I y N205S), NS2 (N29S, T48A y M83I).

En el segmento de la Polimerasa Basica 2 (PB2) identificamos las variantes I354L y V334M en todos los aislados peruanos del 2015-2016 que fueron reportadas como mutaciones coevolutivas descritas en proximidades al bolsillo del dominio de unión al CAP de la polimera PB2 que presenta un papel crítico en el mecanismo cap-snatching durante la transcripción viral; estas mutaciones fueron modeladas acopladas a un análogo ARNm-CAP (m7GTP), este complejo generó un mayor número de puentes de hidrógeno mejorando la afinidad de unión al ligando, por lo que influye aumentando la patogenicidad del virus (Bhoye *et al.*, 2016); por lo tanto estas

mutaciones estarían relacionadas a una infección viral exitosa en los aislamientos peruanos del 2015-2016.

Se identificó en PB2 las variaciones D195N y V731I para nuestros aislados peruanos, estas variaciones (junto a la variación N456S) fueron descritas por Dakhave *et al.* (2013) despues de la pandemia en la India. Por otro lado, la firma genómica descrita por Chen y Shih (2009), en las posiciones A44, A271, L475, D567, T588, V613, E627 y K702, estan conservadas en todos los aislados analizados con excepción de la variación E627K detectada en dos aislados (A/LaLibertad/INS5_380/2015 y A/Lambayeque/INS5_514/2015). Ya que el segmento PB2 en H1N1pdm09 es de origen aviar y H1N1 estacional humano presenta una lisina en esa posición, inferimos que la variación E627K es un proceso de adaptación del virus a su hospedero humano.

En el segmento de la Polimera Basica 1 (PB1) nosotros hallamos las variaciones G154D, I397M, y I435T en todos nuestros aislados peruanos al igual que Dakhave *et al.* (2013) en su estudio post pandemia. La firma genómica descrita por Chen y Shih (2009) en las posiciones R327 y I336 estan conservadas en todos los aislados peruanos del 2015 y 2016 con excepción de la variación R327K detectada en un aislado (A/LaLibertad/INS5_380/2015). Ya que el segmento PB1 en H1N1pdm09 es de origen del virus influenza estacional humana que presenta una lisina en esa posición, inferimos que la variación R327K es un proceso de adaptación del virus a su hospedero humano.

Para el segmento de la Polimerasa Acida (PA) nosotros identificamos las variaciones V100I y I330V en todos los aislados peruanos analizados al igual que Dakhave *et al.* (2013) descrito en su estudio de la India caracteristico de variaciones que aparecieron post pandemia. Con respecto a la firma genómica descrita por por Chen y Shih (2009) las posiciones P28, D55, R57, V100, S225, L268, R356, A404, N409 y T552 se encuentran conservados en todos nuestros aislados peruanos del 2015 – 2016 con excepción de dos aislados (A/LaLibertad/INS5_380/2015 y

A/Lambayeque/INS5_514/2015) que presentan las variaciones A404S, N409S y T552S. Debido a que el segmento PA en H1N1pdm09 es de origen aviar y H1N1 estacional humano presenta una seria en la posición 404, 409 y 552 inferimos que las variación A404S, N409S y T552S son un proceso de adaptación del virus a su hospedero humano.

Nogales *et al.* (2018) reportaron las variaciones V100I, P224S, N321K, I330V, R362K en el gen PA; V100I, N204S, R221Q y L229S en el gen PA-X; E55K, L90I, I123V, E125D, K131E y N205S en NS1 según su estudio evalúa una recombinante con las mutaciones descritas (PA - PAX - NS1) evaluando la actividad de NS1 y PA-X, el crecimiento viral y el efecto de la patogénesis en ratones (evaluación de la masa corporal y la sobrevivencia), los resultados indican que la mutante presentó un crecimiento viral mas alto que el normal y menor sobrevivencia; NS1 aumenta la inhibición de la expresión génica del hospedero (Clark *et al.*, 2017) a diferencia de PA-X; sin embargo las mutaciones de NS1 restauran esta inhibición haciendo que el recombinante con cambios mutacionales en NS1 y PA-X aumenten la virulencia del virus. Nosotros identificamos estas variaciones aminoacídicas en PA, PA-X y en NS1 en nuestros aislados peruanos del 2015 y 2016 inferiendo que estas variaciones aumentan la virulencia del virus influenza A(H1N1)pdm09.

Para el segmento de Hemaglutinina (HA), nosotros hallamos las variaciones P100S, S202T, S220T, E391K S468N y I338V en todos nuestros aislados peruanos, estas variaciones (junto con las variaciones S101G, S200P y R240Q) fueron descritas por Dakhave *et al.* (2013) y Potdar *et al.* (2010) despues de la pandemia en la India. También hallamos las variaciones K300E y E516K en nuestros aislados, estas junto a la variacion S160G fueron descritos pos Dakhave *et al.* (2013) como característicos del 2011 a 2013.

Las variaciones D114N (gen HA1, cambio acídico a básico), S202T (gen HA1, sitio antigénico Sb, cambio polar), S220T (gen HA1, sitio antigénico Ca1, cambio polar), K300E (gen HA1, cambio básico a acídico), E391K (gen HA2, cambio acídico

a básico) y E516K halladas en nuestros aislados peruanos aparecieron temprano en el estudio evolutivo del 2009 al 2017 reportado por Al Khatib (2018). Las variaciones D114N, K300E y E516K aparecieron en el 2013 y se fija en las siguientes temporadas (Jones *et al.*, 2019), K300E fue descrita en el 2009 y en el 2015 se establece mayoritariamente (Al Khatib *et al.*, 2018). La variacion S202T pasa del 17% en el 2010 a 98% en el 2013 (Al Khatib *et al.*, 2018), Jones *et al.* en el 2019 describe esta variante en el 2012 en cepas de la india, E391K y E516K son descritas en el 2011 e incrementa su frecuencia en las siguientes estaciones (Khatib *et al.*, 2018; Jones *et al.*, 2019). P100S, S220T y I338V; fueron descritas en la India en el 2009 (Jones *et al.*, 2019) dichas variantes también fueron halladas en todos los aislados peruanos del 2015-2016.

Además, identificamos la variación A13T (HA) en todos nuestros aislados del 2015-2016 y la variación S101N en la mayoría de nuestros aislados, estas variaciones fueron reportadas en el 2015 por Jones *et al.* (2019).

Identificamos la variación S179N (gen HA1) en todos los aislados peruanos del 2015 – 2016, que presenta un sitio de glicosilación, y se encuentra en el sitio antigénico Sa del gen HA1 (dominio globular), fue descrita a comienzos del 2015 y se acentuó como un cambio dominante adquieriendo una capacidad de escape inmune (Al Khatib *et al.*, 2018). También identificamos la variante D114N en todos nuestros aislados identificándose como una variante estable para el 2013, esta se encuentra involucrada con la presentación de epitopes de células T a MHC (Al Khatib *et al.*, 2018).

También hallamos la variacion K180Q (HA) en todos nuestros aislados que fue reportada a partir del 2015 como una variante dominante (Al Khatib *et al.*, 2018), ésta no genera cambios en la estructura secundaria de la proteína Hemaglutinina y junto a la variante A273E fue descrita en el 2014, siendo la variante K180Q una determinate de las cepas que circulan antes y después del 2013 (Jones *et al.*, 2019)

La variante S202T identificada en nuestros aislados fue involucrada en la funcionabilidad del gen HA incrementado la avidez de la unión al receptor (Al Khatib *et al.*, 2018; Jones *et al.*, 2019).

La variante I233T identificada en nuestros aislados se encuentra en el gen HA1, sitio RBS y presenta un cambio aminoacídico de no polar a polar, teniendo una frecuencia de 5,3% (2009), 10,7% (2012) y en el 2016 pasa a variante mayoritaria (Al Khatib *et al.*, 2018). I233T actúa en el sitio de unión al glicano disminuyendo la especificidad haciendo que el virus pueda unirse a diferentes hospederos (Jones *et al.*, 2019).

La variante A273T y S468N (HA) fueron identificadas en todos nuestros aislados peruanos, la variante A273T fue detectada en el 2009 en porcentajes bajos y para el 2015 forman parte de las mutaciones comunes del virus (Al Khatib *et al.*, 2018) y la variante S468N fue descritas en el 2012 por Jones *et al.* (2019) en la India.

Además de las mutaciones decritas en HA existen otras variaciones que son conocidas como mutaciones fugaces o mutaciones deleterias. Las mutaciones fugaces son caracterizadas por aquellas que aparecen en una temporada y desaparecen en otras como la N277D que apareció en EEUU y Europa desapareciendo años después, N48D identificada en el 2010 y luego desapareciendo, S203T aparece 2009 con el 1% sube a 15% y desaparece años después, N387H y N458K descrita en Europa en el 2009 llega a un 15% y a fines del 2010 desaparece. Las mutaciones deletéreas son caracterizadas en la afección de la funcionabilidad de HA, esto explicaría la rápida desaparición de las mutaciones N458K (2010) y E508G (2014) (Al Khatib *et al.*, 2018). En nuestro estudio nosotros no identificamos estas mutaciones descritas previamente, sin embargo, hallamos algunas variantes que podrían caer en este grupo como mutaciones fugaces como N16K, S200P y D489N que se encuentran solo en un par de nuestros aislados sin que exista evidencia del rol biológico que estas puedan desencadenar.

Por otro lado, las posiciones del sitio RBS 201-208, 235-242, 148-152, Y108, W167, H197 y Y209 (Fang *et al.*, 2014) no presentan variaciones en HA de nuestros aislados peruanos del 2015 -2016 al igual que las posiciones de los sitios antigénicos 70,174,177,412,454 descritos por Saxema *et al.* (2010).

Las variaciones en la cabeza de la Hemaglutinina limitan la efectividad de la vacuna, por lo que Christensen *et al.* (2019) propusieron la creación de una vacuna dirigida a la generación de anticuerpos a zonas conservadas (cuello de hemaglutinina); en sus ensayos encuentran que los anticuerpos anti-cuello están asociados a la protección, pero son atenuados, por lo que los anticuerpos anti-cabeza de HA siguen siendo mas eficientes.

Nosotros identificamos diversas variaciones aminoacídicas en la cabeza de la hemaglutinina, en sitios antigénicos y que están relacionadas al escape inmunológico; sin embargo, es necesario un estudio de neutralización e inhibición de la hemaglutinina para confirmar la efectividad de la vacuna. A pesar de ello nosotros identificamos que nuestros aislados peruanos se encuentran relacionados filogeneticamente lo cual es un indicativo en la reduccion de un posible impacto epidémico sobre los grupos de riesgo o población en general.

Para el segmento de la Nucleoproteina (NP) se identificó las variaciones V100I y S498N en todos los aislados peruanos del 2015-2016 la variante V100I también fue reportata por Padilla *et al.* (2013) en una cepa peruana del 2013. Con respecto a la firma genómica descrita por por Chen y Shih (2009) las posiciones G16, I33, I61, I109, R214, L283, R293, K305, V313, K357, E372, R422, T442 y D455 se encuentran conservados en todos nuestros aislados peruanos del 2015 – 2016 con excepción de la posición V100 que se encuentra mutada en todos los aislados peruanos analizados (V100I). Debido a que el segmento NP en H1N1pdm09 es de origen porcino y H1N1 estacional humano presenta una I100 inferimos que la variación V100I es un proceso de adaptación del virus a su hospedero humano.

Nosotros también hallamos la variación M105T (NP) en la mayoría de nuestros aislados peruanos y que ha sido descrita a comienzos del 2013/2014 con un 6% pasando luego a 86% entre 2015/2016 en muestras de Rusia (Komissarov *et al.*, 2016).

En un estudio de Kim *et al.* en 2019 evaluaron una recombinante con dos mutaciones sinérgicas en NP-V100I (presente en todos nuestros aislados) y NA-D248N obteniendo que funcionan de manera sinérgica en el ensamblaje y liberación viral, aumentando la patogenicidad viral, en tanto estas mutaciones de forma individual resultan menos patogénicas que en sinergia; por lo tanto, la variación V100I presente en todos nuestros aislados peruanos podrían contribuir en la patogenicidad del virus.

Para el segmento de Neuraminidasa (NA) nosotros identificamos las variantes N248D en todos nuestros aislados característico de aislados del 2009 junto a la variante V106I, también identificamos las variantes V241 y N369K que aparecieron en la fase tardía de la pandemia (Jones *et al.*, 2019).

Nosotros identificamos las variantes I34V, L40I, V241I, V264I, I321V en NA que son clasificadas en el Grupo 1 caracterizados por no tener efecto secundario en la estructura secundaria, aunque la variante I34V adopta una estructura helicoidal, ésta no afecta su estructura 3D; y las variantes N44S, N200S, N270K, N369K, N386K, K432E son clasificadas en el Grupo 2, las variantes N44S y N200S presentan cambios en la naturaleza y tamaño de la cadena lateral R, las variantes N270K, N369K, N386K, K432E están en la superficie del loop por lo que podrian adoptar una estructura helicoidal (Jones *et al.*, 2019).

La variante N44S (NA) es una variante común del 2010 - 2015 reportada en Iran junto con las variantes N200S, N248D reportadas tambien en nuestro estudio junto a V106I aparecieron en el 2013 – 2014. (Moasser *et al.*, 2017)

Las variaciones N270K, N200S, V241I, N248D de NA que fueron reportadas en el 2015 en todas las cepas de la India y las variantes V264I, I314M en todos nuestros aislados del 2015-2016 que fueron resportados en menor proporción en el 2015 junto a S285Y y E287K (Jain *et al.* 2017). Mientras que las variantes relacionadas a la resistencia a oseltamivir (H275Y) (Liu *et al.*, 2019, Jones *et al.*, 2019), u otras que reducen la susceptibilidad al oseltamivir como S247N (Moasser *et al.*, 2018),sin embargo hallamos la variante V241I que junto con H275Y han emergido simultáneamente para generar un efecto sinergico para reducir la sensibilidad del virus a oseltamivir (Liu *et al.*, 2017); tampoco hallamos cambios en las posiciones I223, H275, Q313, I427 que podrían causar cambios en la unión del inhibidor de la neuraminidasa. (Jones *et al.*, 2019), ni identificamos las variantes R152K relacionada a la resistencia a Zanamivir o S247N y I223V/R que reducen la susceptibilidad de los inhibidores de la neuraminidasa (Liu *et al.*, 2019). Sin embago encontramos las variantes V241I, N369K, N386K, K432E relacionadas al cambio de patrón de unión y la afinidad de oseltamivir a neuraminidasa (Liu *et al.*, 2019), la variante K432E afecta el sitio activo favoreciendo la resistencia a antivirales (Jones *et al.*, 2019).

Asimismo, la variante I321V en NA en todos los aislados peruanos, ha sido descrita junto a cepas resistentes; sin embargo, no genera un efecto sinergico, a diferencia de las variantes V241I, N369K, N386K y K432E que si presentan un efecto significativo en el cambio conformacional generando un aumento en la resistencia a oseltamivir reduciendo la afinidad de esta a la neuraminidasa solas o en sinergia con H275Y aumentan la resistencia a oseltamivir (Liu *et al.*, 2017).

En nuestro estudio encontramos estas 4 mutaciones (V241I, N369K, N386K y K432E) en todas las cepas peruanas por lo que podríamos inferir que al estar asociadas con el efecto en la interaccion de NA y oseltamivir podrían tener un nivel de efecto en la resistencia por lo que es de importancia un estudio de docking molecular a fin de confirmar estas interacciones en las cepas peruanas.

En 4 aislados peruanos la variante I117M en NA no altera la sensibilidad a oseltamivir contrario a la mutacion I177V que confiere una reducción ligera a la sensibilidad a oseltamivir y en sinergia con H275Y aumenta la resistencia a oseltamivir (Hurt *et al.*, 2012), también hallamos la variante I365T en estos 4 aislados peruanos, variante que se encuentra cerca al sitio activo de la neuraminidasa (Liu *et al.*, 2015).

También se encontró que las posiciones de los residuos del sitio activo de NA (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 Y406) y las posiciones de los residuos estructurales (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, E277, N294, E425) (Colman *et al.*, 1993) se encuentran conservados en todos los aislados peruanos del 2015 -2016 analizados.

En el segmento de la Matriz (M) nosotros hallamos variaciones en los dos genes M1 y M2, identificando la variante D21G (M2) en todos nuestros aislados peruanos al igual que Dakhave *et al.* (2013) en su estudio post pandemia. La firma genómica descrita por Chen y Shih (2009) en las posiciones V115, T121 y T137 para M1 y T11, S20, Y57, V86 y N93 para M2 estan conservadas en todos los aislados peruanos del 2015 y 2016. La variación Q208K (M1) identificado en la mayoría de nuestros aislados fue reportado en el 2014/2015 alcanzando un 83% para 2015/2016 en Saint Petersburg (Komissarov *et al.*, 2016).

En el segmento de las proteínas no estruturales (NS) nosotros hallamos variaciones en los dos genes NS1 y NS2, identificando la variante L90I (NS1), T48A (NS2) en todos nuestros aislados peruanos al igual que Dakhave *et al.* (2013) en su estudio post pandemia. La firma genómica descrita por Chen y Shih (2009) en las posiciones I81 y la deleción 227 para NS1 y L107 para NS2 estan conservadas en todos los aislados peruanos del 2015 y 2016.

La variante R21Q en NS (presente en los aislados peruanos A/Cusco/INS5_825/2015 y A/Lambayeque/INS5_790/2015), ha sido reportada en un estudio realizado por Jureka *et al.* (2019) la cual no afecta la estructura del $NS1^{RBD}$

(Dominio de interacción a ARN de NS1) y no afecta la replicación viral; sin embargo, mejora la recuperación de ratones infectados indicando que la mutacion R21Q hace menos patogénica al virus.

A demás de las mutaciones descritas existen otras mutaciones (Tabla 10 -17) que se encuentran en nuestros aislados, pero no existe evidencia del rol biológico que puedan desencadenar.

En este estudio, aunque no encontramos la mutación H275Y relacionada a resistencia a oseltamivir, las variaciones encontradas en común en todas las cepas peruanas tienen alguna relación en el efecto de la susceptibilidad o resistencia de NA al oseltamivir de acuerdo a los giros que puedan presentar en su estructura tridimensional. Por lo que no se descarta la necesidad de mantenar la vigilancia molecular con el objetivo de detectar variantes en estas cepas que tengan potencial en incrementar la severidad de la enfermedad.

La generación de brotes estacionales por el virus influenza A(H1N1)pdm09, acompañado del uso de drogas antivirales durante la infección como tratamiento, podría venir acompañado de las resistencia a los inhibidores de neuraminidasa (INA), como el ocasionado por el uso de amadantinos que generó la resistencia a los bloqueadores del canal M2, dejando obsoleto el uso de este antiviral. Este panorama hace compleja la vigilancia epidemiológica en la toma de decisiones para el tratamiento y el diseño de la vacuna. Los resultados obtenidos se muestran sensibles a los INA brindando una seguridad en el tratamiento, a diferencia del estudio de Garcia *et al.* (2013), que reporta la primera mutacion relaciona a la resistencia a INA en el Perú, afortunadamente este virus no se propago o predomino sobre las otras variantes.

Estas variaciones aminoacidicas en las proteínas virales son producto de los errores durante la replicación del genoma, las cuales se van fijando y transmitiendo a la descencia viral. Asimismo, estas variaciones otorgan diferentes cualidades a las proteínas que pueden afectar diversas etapas del ciclo de vida viral o su interacción

con el hospedero. Esta relación del huésped-virus es catalogada como una relación predador-presa que conlleva una evolución antagonista que dirige la aparición de fenotipos, especialización y especiación, por parte de los virus que infectan células, por otro lado, la respuesta del hospedero (ya sea una respuesta inmune humoral y/o celular) también puede evolucionar para combatir la infección viral (Voskarides *et al.*, 2018). Por parte del huésped se ha descrito que diferentes efectores inmunes como MHC, TLR y ITM3 han evolucionado para una mejor respuesta inmune contra influenza; cada haplotipo del MHC genera una respuesta inmune diferente por reconocer con mayor o menor eficacia las proteínas virales; por parte del virus influenza este ha evolucionado en sus nucleoproteínas, hemaglutinina y neuraminidasa para adaptarse al huésped (Voskarides *et al.*, 2018). Una población viral puede adquirir mutaciones que van acumulándose permaneciendo escondidas a su huésped y que se va transmitiendo, escondiendo el peligro para ganar una adaptación gradual (Dinis *et al.*, 2016).

6.5. Concordancia entre HRM y secuenciación

Nosotros identificamos que los genotipos caracterizados por HRM en base a la combinación de dos genes (HA y M) son diferenciados en el árbol filogenético del genoma completo (Figura 28), lo cual indica que el análisis de HRM es efectiva para la identificación de genotipos de Influenza A(H1N1)pdm09, esto sumado a las cualidades de la técnica de HRM en tiempo y costo-efectivo hace que esta técnica sea apropiada para la identificacion de genotipos.

Los resultados indican que de los 10 genotipos identificados por HRM, 8 genotipos se encuentran diferenciados por filogenia, esto podría deberse a que en el análisis del árbol filogenetico se usó el genoma completo, que brinda mayor información sobre la variación de los aislados peruanos circulantes durante los años 2015 y 2016 en comparación con el análisis de HRM que fue basado en un segmento de 136pb del gen de la Matriz y 200pb del gen Hemaglutinina además de ello los 2

genotipos que fueron indistinguibles por HRM muestran una frecuencia baja en su perfil (el genotipo III es 0,7% y genotipo IX es 2,09%).

Los tres genotipos asociados a la clasificación clínica IRAG por HRM (Genotipo I, II y VIII) muestran variaciones aminoacídicas determinadas por secuenciación de su genoma, estas variaciones estan relacionadas al aumento de resistencia a oseltamivir (NA: V241I/N369K/N386K/K432E), incremento de la avidez del virus en su unión al receptor (HA: S202T), disminución de la especificidad al hospedero habilitando al virus a unirse a diferentes hospederos (HA: I233T), contribución en la patogenicidad y proceso de adaptación (NP: V100I); además de estas variaciones también encontramos variaciones especificas del genotipo I ligado a un proceso de adaptación al huésped (PB2: E627K, PB1: R327K y PA: A404S/N409S/T552S), y para el genotipo II la variación NS: R21Q relacionada a la disminución de la patogenicidad; todas estas variaciones afectan la relación huésped-virus. Algunas variaciones observadas pueden contribuir al aumento de la patogenicidad del virus, mientras que otras a su atenuación y adaptación al hospedero (Voskarides *et al.*, 2018).

Ademas, encontramos mutaciones en el genotipo I: A184T/I463V/R591Q/V613A/E627K/L645M (PB2), R327K/V709I/V728 (PB1), P400L/A404S/V407I/N409S/S421N/T552S/V557I/I573V/T618A (PA), V425I/V444I (NP), I117M/D199N/I365T (NA), G189D/E196K/I198L/T56K (NS); genotipo II: A184T (PB2), R211K/N175D (PB1), L649I/T263M (PA), V425I/V444I (NP), I117M/D199N/I365T (NA), R21Q/T56K (NS) y mutaciones en el genotipo VIII E69V (PB2), P394H (PB1), V628M (PA), E16G (M2). Aunque no exista descripción de la función biológica de todas las variaciones encontradas podríamos inferir que estas variaciones en su conjunto podrían marcar las diferencias entre los genotipos asociados a una clasificación clínica IRAG.

Estas variaciones presentes en los genotipos de mayor frecuencia que están relacionadas a diferentes procesos de adaptación y patogenicidad, asi como al cuadro clínico IRAG por lo que podríamos deducir que el virus de influenza A(H1N1)pdm09

tiene una alta tasa de variabilidad génica. Aunque el salto genético sea mas rápido que la deriva antigénica (Voskarides *et al.*, 2018), los cambios aminoacídicos son muy importantes en el proceso de evolución del virus.

El uso de HRM para la identificación de genotipos para influenza A(H1N1)pdm09 podria usarse como un método de screening para la identificación de genotipos cantidatos a secuenciación para su caracterización. El uso de estas dos metodologias en combinación podrían formar parte de la vigilancia oportuna de los virus influenza A(H1N1)pdm09.

6.6. Análisis estructural *in sílico*

Nosotros hemos modelado la proteína HA y NA de influenza A(H1N1)pdm09, la calidad de estos modelos tridimensionales obtenidos fue evaluada mediante el índice de Ramachamdram obteniendo que los modelos obtenidos para HA y NA se encuentran por encima del 97%, lo cual indican que son modelos aceptables en comparación con estudios similares (Ikram *et al.*, 2018).

Para comparar los modelos de las proteínas de los aislados con el modelo de la cepa vacunal se realizó el análisis de la desviación de la raíz media cuadrada de la distancia posicional entre átomos (RMSD, siglas en inglés), siendo este el método de comparación más usado (Kufareva *et al.*, 2012). Nuestros resultados indican que existe una mínima variación en la estructura tridimensional de las proteínas HA de los aislados con respecto al modelo de la proteína HA de la cepa vacunal A/California/07/2009 entre 0,230 a 2,328 A° y con A/Michigan/45/2015 entre 0 a 1,665 A°, estos resultados indican que los modelos de nuestros aislados peruanos tienen menor variación en comparación con la cepa vacunal A/Michigan/45/2015; esto concordaría con la actualización de la vacuna del uso de la cepa vacunal A/California/07/2009 (2015-2016) al uso de cepa vacunal A/Michigan/45/2015 (2017-2020).

Para la proteína modelada NA de los aislados peruanos los valores de RMSD están en un rango entre 0,114 a 0,637 A° cuando son comparados con NA de la cepa vacunal A/California/07/2009 y un rango de RMSD entre 0,001 a 0,567 A° cuando se compara con NA de la cepa A/Michigan/45/2015, estos resultados indican que las proteínas de nuestros aislados peruanos no presentan una variación estructural significativa.

Las posiciones que tienen alta frecuencia de variacionen HA están en cuatro dominios antigénicos: Ca, Cb, Sa y Sb, estos podrían afectar la unión al receptor y por ende contribuirian con la virulencia del virus (Martinez *et al.,* 2009). Nosotros encontramos variaciones puntuales, en 3 dominios antigénicos (S179N y K180Q en Sa, S202T en Sb y S220T en Ca1) que se encuentran en el dominio globular HA1 y uno en el sitio de unión al receptor I233T. También describimos que la variante K180Q no genera cambios en la estructura secundaria, pero si cambios en la interacción con la cadena lateral de F134 resultando en una interacción de apilamiento. Mientras que la variante I233T podría generar una ligera ampliación del sitio activo al modificar la conformación de un bucle (aminoácidos 230-242) componente del sitio de unión a glicanos (Jones *et al.*, 2019).

Un cambio observable en el análisis *in sílico* estructural de NA es la variación N44S que genera un cambio del dominio de una conformación coil a una estructura β plegada; sin embargo, esta variación no esta asociada a la resistencia a oseltamivir (Liu *et al.,* 2017).

Por otro lado, la mutación I321V de NA puede cambiar su hidrofobicidad mas no afecta en su conformación. Mientras que las mutaciones V241I, N369K, N386K y K432E de NA solas o en presencia de la mutación H275Y afectarian la interración de NA con oseltamivir, V241I cambian el efecto hidrofobico, afectando la cadena R de los residuos H275 o D151 generando giros que alejan o debilitan la interacción con oseltamivir y en presencia de la mutacion H275Y afectan el bolsillo de unión con oseltamivir alargándose, lo que genera una debilidad con la interración con oseltamivir,

N369K genera una carga positiva mas fuerte cambiando el campo electrostático cuando las dos mutaciones N369K y K432E se encuentran simultaneas hace que la carga positiva se rompa y el bolsillo de unión se contraiga ligeramente y la conformación de oseltamivir gire por lo que debilita la unión a oseltamivir, la mutación N386K genera una carga positiva aumentando la interacción con los residuos Asp384 con los bucles N378-S388, P328-C335 y S339-G345 afectando la interacción con oseltamivir, por otro lado la combinación de las mutaciones N386K y V241I generan un cambio conformacional que afecta a los residuos R368, E119, D151 y R152 que formaban una interacciones fuerte con los grupos -COO-, NH2 y –COCH3 de oseltamivir alejándolo del bolsillo de unión (Liu *et al.*, 2017); estas variaciones asociadas con la resistencia a antivirales son encontradas en NA de nuestros aislados peruanos; sin embargo al ser estudios en base a algoritmos y modelos matemáticos es necesario evaluar estas variaciones en modelos *in vitro* o *in vivo* para comprobar la relación con la resistencia a los antivirales.

Este estudio permitió obtener información más amplia y actualizada con respecto al genoma completo del Virus Influenza A(H1N1)pdm09 de las cepas circulantes en el territorio peruano, con énfasis en la relación filogenética, variabilidad antigénica y resistencia a antivirales.

Los resultados obtenidos indican que existe la necesidad de optener infomacion oportuna del desarrollo y evolución del virus influenza para una buena toma de decisiones en la prevención, diagnostico y tratamiento de las cepas circulantes en territorio peruano.

Entre las limitaciones del presente estudio podemos indicar el hecho usar muestras tomadas del Sistema de Vigilancia Nacional de casos de infecciones respiratorias del Perú podemos tener algún sesgo en los resultados. Sin embargo, hay que señalar que este sistema de vigilancia es el más completo en nuestro país siendo las muestras analizadas representativas. Asimismo, el método de HRM es un método menos sensible para detectar genotipos que otros usados como secuenciación del

genoma viral parcial o total, podemos indicar que el HRM es más económico que secuenciar pudiendo ser utilizado para clasificar genotipos que luego puedan ser caracterizados más profundamente por secuenciación.

VII. CONCLUSIONES

- Se caracterizó los perfiles de High Resolution Melting para el gen Hemaglutinina y de la matriz, obteniendo 10 genotipos mas frecuentes del virus Influenza A(H1N1)pdm09 durante los años 2015 – 2016.

- Se secuenció el genoma completo del virus influenza A/(H1N1)pdm09 correspondientes a los genotipos hallados por HRM agrupándose todas las cepas en el Clado 6B y 6B1. Se puede observar diferentes nodos dentro del clado 6B que indicaría la variedad de genotipos.

- Los resultados obtenidos mostraron variación nucleotídica que generan cambios de aminoácidos no sinónimos en todos los segmentos del genoma en comparación con la cepa vacunal, los mas importantes son los ubicados en los sitios antigénicos de HA (S202T, S179N, S220T), la variación en HA (I233T) asociada a la disminución de la especificidad del virus por su hospedero, y aquellos asociados a una disminución de la interacción de NA y oseltamivir (V241I, N369K, N386K y K432E).

- El análisis estructural de los modelos *in silico* de la proteína HA de los aislados peruanos en comparación con el modelo de la cepa vacunal indica que no existen cambios estructurales significativos. En NA se detectó la variación N44S que produce un cambio estructural en dominio N-terminal.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio de Docking Molecular a fin de evaluar si las mutaciones observadas afectan la interacción de NA con oseltamivir.

- Reforzar la vigilancia molecular de influenza en el Perú y Sudamérica dados los pocos datos que existen actualmente de esta región del mundo, poniendo especial énfasis en detectar mutaciones en neuraminidasa que puedan afectar el tratamiento antiviral.

- Implementar los métodos biologicos de resistencia para poder identificar posibles aislamientos con resistencia a antivirales en el Perú, los cuales deben ser caracterizados molecularmente.

- Implementar métodos biológicos de neutralización de los anticuerpos generados por la vacuna actual contra los aislados peruanos, y aquellos aislados que no sean neutralizados por estos anticuerpos deben ser caracterizados molecularmente.

- Complementar los hallazgos del análisis estructural *in silico*, con la determinación de la estructura proteica mediante cristalografía.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL KHATIB H.A.; AL THANI A.A.; YASSINE H.M. (2018). Evolution and dynamics of the pandemic H1N1 influenza hemagglutinin protein from 2009 to 2017. *Arch Virol.* 163(11):3035-3049. doi: 10.1007/s00705-018-3962-z

ARANGO A.E.; JARAMILLO S.; PEREZ J.; AMPUERO J.S; ESPINAL D.; DONADO J.; FELICES V.; GARCIA J.; LAGUNA-TORRES A. (2015). Influenza-like illness sentinel surveillance in one hospital in Medellin, Colombia. 2007-2012. *Influenza Other Respir Viruses.* 9(1):1-13.

ARIAS C.F.; ESCALERA-ZAMUDIO M.; SOTO-DEL RÍO M.L.; COBIÁN-GÜEMES A.G.; ISA P.; LÓPEZ S. (2009). Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res*. 40(8):643-54.

ARONESTY E. (2011). ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data. http://code.google.com/p/ea-utils (Durham, NC).

BAILLIE G.J; GALIANO M.; AGAPOW P.M.; MYERS R.; CHIAM. R.; GALL A.; PALSER A.L.; WATSON S.J.; HEDGE J.; UNDERWOOD A.; PLATT S.; MCLEAN E.; PEBODY R.G.; RAMBAUT A.; GREEN J.; DANIELS R.; PYBUS O.G.; KELLAM P.; ZAMBON M. (2012). Evolutionary dynamics of local pandemic H1N1/2009 influenza virus lineages revealed by whole-genome analysis. *J Virol.* 86(1):11-8. doi: 10.1128/JVI.05347-11. Epub 2011 Oct 19.

BARRERO P.R.; VIEGAS M.; VALINOTTO L.E.; MISTCHENKO A.S. (2011) Genetic and Phylogenetic Analyses of Influenza A H1N1pdm Virus in Buenos Aires, Argentina. *J Virol.* 85(2):1058-66.

BAUTISTA E.; CHOTPITAYASUNONDH T.; GAO Z.; HARPER S.A.; SHAW M.; UYEKI T.M.; ZAKI S.R.; HAYDEN F.G.; HUI D.S.; KETTNER J.D; KUMAR A.; LIM M.; SHINDO

N.; PENN C.; NICHOLSON K.G. (2010). Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med*. 362:1708-19.

BANKEVICH A.; NURK S.; ANTIPOV D.; GUREVICH A. A.; DVORKIN M.; KULIKOV A. S.; LESIN V. M.; NIKOLENKO S. I.; PHAM S.; PRJIBELSKI A. D.; PYSHKIN A. V.; SIROTKIN A. V.; VYAHHI N.; TESLER G.; ALEKSEYEV M. A.; PEVZNER P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology, 19(5), 455–477.

BAO Y.; BOLOTOV P.; DERNOVOY D.; KIRYUTIN B.; TATUSOVA T. (2007). FLAN: a web server for influenza virus genome annotation. Nucleic Acids Research 35:W280–284. doi: 10.1093/nar/gkm354

BAZ M.; ABED Y.; PAPENBURG J.; BOUHY X.; HAMELIN M.E.; BOIVIN G. (2009). Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med.* 361:2296-7.

BHOYE D.; BEHERA A.K.; CHERIAN S.S. (2016). A molecular modelling approach to understand the effect of co-evolutionary mutations (V344M, I354L) identified in the PB2 subunit of influenza A 2009 pandemic H1N1 virus on m7GTP ligand binding. *J Gen Virol.* 97(8):1785-96. doi: 10.1099/jgv.0.000500

BIEBRICHE C.F. (1999). Origin and evolution of viruses. Chapter 4: Mutation, competition and selection as measured with small RNA molecules. Edited By Esteban Domingo, Robert Webster and John Holland. *Academic Press*. 72-75.

BOIVIN G.; GOYETTE N.; BERNATCHEZ H. (2002). Prolonged excretion of amantadine-resistant influenza a virus quasi species after cessation of antiviral therapy in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis.* 1;34(5):E23-5.

BRIGHT R.A.; SHAY D.K.; SHU B.; COX N.J.; KLIMOV A.I. (2006). Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005--2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295:891-4.

BROWN I.; HARRIS P.; MCCAULEY J.; ALEXANDER D. (1998). Multiple genetic reassorment of avian and human influenza A viruses in european pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol.* 79: 2947-2955.

BOUCKAERT R, HELED J, KÜHNERT D, VAUGHAN T, WU C-H, XIE D, ET AL. (2014) BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Comput Biol 10(4): e1003537. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537

CADY S.D.; SCHMIDT-ROHR K.; WANG J.; SOTO C.S.; DEGRADO W.F.; HONG M. (2010). Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature.* 463(7281):689-92

CAO, Y.; LIU, H.; YAN, Y.; LIU, W.; LIU, D.; LI, J. (2021). Discriminating Clonotypes of Influenza A Virus Genes by Nanopore Sequencing. Int. J. Mol. Sci. 22, 10069. https://doi.org/10.3390/ijms2218100

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL CENTER FOR IMMUNIZATION AND RESPIRATORY DISEASES (NCIRD). (2016). Summary of the 2015-2016 Influenza Season. USA. Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado de: http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/season/flu-season-2015-2016.htm.

CENTROS PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES (CDC). (2009) Pandemia de gripe infección por el virus A (H1N1) resistente al oseltamivir en dos campistas de verano reciben profilaxis-Carolina del Norte, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 58: 969-972.

CHEN G.; SHIH S. (2009). Genomic Signatures of Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus. *Emerg Infect Dis.* 15(12), 1897-1903. https://dx.doi.org/10.3201/eid1512.090845.

CHEN N.; PINSKY B.A.; LEE B.P.; LIN M.; SCHRIJVER I. (2011). Ultrasensitive Detection of Drug-Resistant Pandemic 2009 (H1N1) Influenza A Virus by Rare-Variant-Sensitive High Resolution Melting Curve Analysis. *J Clin Microbiol*. 49 (7): 2602 - 2609. doi:10.1128/JCM.00277-11

CHRISTENSEN S.R.; TOULMIN S.A.; GRIESMAN T.; LAMERATO L.E.; PETRIE J.G.; MARTIN E.T.; MONTO A.S.; HENSLEY S.E. (2019). Assessing the protective potential of H1N1 influenza virus hemagglutinin head and stalk antibodies in humans. *J Virol.* 93:e02134-18. https://doi.org/10.1128/JVI.02134-18.

CINGOLANI P.; PLATTS A.; WANG L.; COON M.; NGUYEN T.; WANG L.; LAND S. J.; LU X.; RUDEN D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. Fly, 6(2), 80–92. https://doi.org/10.4161/fly.19695.

CLARK A.M.; NOGALES A.; MARTINEZ-SOBRIDO L.; TOPHAM D.J.; DEDIEGO M.L. (2017). Functional evolution of influenza virus NS1 protein in currently circulating human 2009 pandemic H1N1 viruses. *J Virol*. 91:e00721-17. https://doi.org/10.1128/JVI.00721-17.

COLMAN P.M.; HOYNE P.A.; LAWRENCE M.C. (1993). Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* 67, 2972–2980.

CURD E.; POLLINGER J.; TOFFELMIER E.; SMITH T. (2011). Rapid influenza A detection and quantitation in birds using a one-step real-time reverse transcriptase

PCR and High Resolution Melting. *J Virol* Methods. 176(1-2):125-30. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.05.033

DAKHAVE M.; KHIRWALE A.; PATIL K.; KADAM A.; POTDAR V. (2013). Whole-genome sequence analysis of postpandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus isolates from India. *Genome Announc.* 1(5):e00727-13. http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00727-13.

DANECEK P.; AUTON A.; ABECASIS G.; ALBERS C. A.; BANKS E.; DEPRISTO M. A.; HANDSAKER R. E.; LUNTER G.; MARTH G. T.; SHERRY S. T.; MCVEAN G.; DURBIN R.; 1000 GENOMES PROJECT ANALYSIS GROUP. (2011). Thehe variant call format and VCFtools. Bioinformatics (Oxford, England), 27(15), 2156–2158. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330.

DARRIBA D.; TABOADA G. L.; DOALLO R.; POSADA D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature methods, 9(8), 772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109.

DAWOOD F.; JAIN S.; FINELLI L. (2009). EMERGENCE OF A NOVEL SWINE-ORIGIN INFLUENZA A(H1N1) VIRUS IN HUMANS. N ENGL J MED. 360(25), 2605-15.

DINIS J.M.; FLOREK N.W.; FATOLA O.O.; MONCLA L.H.; MUTSCHLER J.P.; CHARLIER O.K.; MEECE J.K.; BELONGIA E.A.; FRIEDRICH T.C. (2016). Deep sequencing reveals potential antigenic variants at low frequencies in influenza A virus-infected humans. *J Virol.* 90:3355–65. doi: 10.1128/JVI.03248-15

DRUMMOND A.; SUCHARD M.; XIE D.; RAMBAUT A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution 29:1969–1973. doi: 10.1093/molbev/mss075

FANG Q.; GAO Y.; CHEN M.; GUO X.; YANG X.; WEI L. (2015). Molecular epidemiology and evolution of influenza A and B viruses during winter 2013-2014 in Beijing, China. *Archives of virology.* 160(4):1083-95.

FANG Q.; GAO Y.; CHEN M.; GUO X.; YANG X.; YANG X.; WEI L. (2014). Molecular epidemiology and evolution of A(H1N1)pdm09 and H3N2 virus during winter 2012–2013 in Beijing, China. *Infect. Genet. Evol.* 228-240.

FIELDS B.N.; KNIPE D.M.; HOWLEY P.M.; GRIFFIN D.E. (2007). Fields virology. 5th. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

GALARDINI M.; BIONDI E. G.; BAZZICALUPO M.; MENGONI A. (2011). CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. Source Code for Biology and Medicine, 6: 11. https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11

GARCIA J.; FELICES V.; GOMEZ J.; GOMEZ E.; LAGUNA-TORRES V.A. (2013). Detection of an influenza a (H1N1) pdm09 strain resistant to Oseltamivir in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 30(1):157-8.

GARCÍA J.; SOVERO M.; TORRES A.L.; GOMEZ J.; DOUCE R.; BARRANTES M.; SANCHEZ F.; JIMENEZ M.; COMACH G.; DE RIVERA I.; AGUDO R.; KOCHEL T. (2009). Antiviral resistance in influenza viruses circulating in Central and South America based on the detection of established genetic markers. *Influenza Other Respir Viruses*. 3(2):69-74.

GARTEN R.; DAVIS C.; RUSSELL C. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 (H1N1) influenza viruses circulating in human. *Science.* 325 (5937), 197-201.

GERLOFF N.A.; KHAN S.U.; ZANDERS N.; BALISH A.; HAIDER N.; ISLAM A.; CHOWDHURY S.; RAHMAN M.Z.; HAQUE A.; HOSSEINI P.; GURLEY E.S.; LUBY S.P.; WENTWORTH D.E.; DONIS R.O.; STURM-RAMIREZ K.; DAVIS C.T. (2016). Genetically Diverse Low Pathogenicity Avian Influenza A Virus Subtypes Co-Circulate among Poultry in Bangladesh. *PLoS ONE*. 11(3): e0152131. doi:10.1371/journal. pone.0152131

GHEDIN E.; LAPLANTE J.; DEPASSE J.; WENTWORTH D.E.; SANTOS R.P.; LEPOW M.L.; PORTER J.; STELLRECHT K.; LIN X.; OPERARIO D.; GRIESEMER S.; FITCH A.; HALPIN R.A.; STOCKWELL T.B.; SPIRO D.J.; HOLMES E.C.; ST GEORGE K. (2011). Deep Sequencing Reveals Mixed Infection with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Strains and the Emergence of Oseltamivir Resistance. *J Infect Dis.* 203(2):168-74.

GOÑI N.; MORATORIO G.; RAMAS V.; COPPOLA L.; CHIPARELLI H.; CRISTINA J. (2010). Phylogenetic analysis of pandemic 2009 influenza A virus circulating in the South American region: genetic relationships and vaccine strain match. *Archives of Virology,* 156(1), 87–94. doi:10.1007/s00705-010-0825-7

GRABHERR M.; HAAS BJ.; YASSOUR M.; LEVIN J.; THOMPSON D.; AMIT I.; ADICONIS X.; FAN L.; RAYCHOWDHURY R.; ZENG Q.; CHEN Z.; MAUCELI E.; HACOHEN N.; GNIRKE A.; RHIND N.; DI PALMA F.; BIRREN B.; NUSBAUM C.; LINDBLAD-TOH K.; FRIEDMAN N.; REGEV A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome Nature Biotechnology 29:644–652. https://doi.org/10.1038/nbt.1883

GUREVICH A.; SAVELIEV V.; VYAHHI N.; TESLER G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics (Oxford, England), 29(8), 1072–1075.

HADFIELD J.; MEGILL C.; BELL S.M.; HUDDLESTON J.; POTTER B.; CALLENDER C.; SAGULENKO P.; BEDFORD T.; NEHER R.A. (2018). Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics.* 1;34(23):4121-4123. doi: 10.1093/bioinformatics/bty407.

HARTMANN N.M.; DARTSCHT M.; SZEWZYK R.; SELINKA H.C. (2013). Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses. J. *Virol.* 10;10:190. doi: 10.1186/1743-422X-10-190.

HSIAO C.C.; CHANG J.; WU J.Y.; LIU W.H.; HAN S.Y.; CHEN P.J.; YEH S.H. (2012). High-resolution melting and real-time PCR for quantification and detection of drug-resistant HBV mutants in a single amplicon. *Antivir Ther.* 17(2):291-303. doi: 10.3851/IMP2022. Epub 2011 Dec 16.

HUANG K.Y.; HUANG Y.CH.; CHIU CH.H.; TSAO K.CH.; LIN T.Y. (2020). Impaired Vaccine-Induced Antibody Response Against Clade 6B H1N1 Viruses in Individuals Before Viral Emergence. *Open Forum Infect Dis.* 11;7(1):ofz513. doi: 10.1093/ofid/ofz513. eCollection 2020 Jan.

HURT A.C.; LEANG S.K.; SPEERS D.J.; BARR I.G.; MAURER-STROH S. (2012). Mutations I117V and I117M and oseltamivir sensitivity of pandemic (H1N1) 2009 viruses. *Emerg Infect Dis.* 18(1):109-12. doi: 10.3201/eid1801.111079.

IKRA IKRAM A.; ZAHEER T.; AWAN F.M.; OBAID A.; NAZ A.; HANIF R.; PARACHA R.Z.; ALI A.; NAVEED A.K.; JANJUA H.A. (2018). Exploring NS3/4A, NS5A and NS5B proteins to design conserved subunit multi-epitope vaccine against HCV utilizing immunoinformatics approaches. *Sci Rep.* 31;8(1):16107. doi: 10.1038/s41598-018-34254-5. PMID: 30382118; PMCID: PMC6208421.

INTHARATHEP P.; LAOHPONGSPAISAN C.; RUNGROTMONGKOL T.; LOISRUANGSIN A.; MALAISREE M.; DECHA P.; ARUKSAKUNWONG O.;

CHUENPENNIT K.; KAIYAWET N.; SOMPORNPISUT P.; PIANWANIT S.; HANNONGBUA S. (2008). How amantadine and rimantadine inhibit proton transport in the M2 protein channel. *J Mol Graph Model.* 27(3):342-8. doi: 10.1016/j.jmgm.2008.06.002. Epub 2008 Jun 8. PMID: 18620883.

ITOH Y.; SHINYA K.; KISO M.; WATANABE T.; SAKODA Y.; HATTA M.; MURAMOTO Y.; TAMURA D.; SAKAI-TAGAWA Y.; NODA T.; SAKABE S.; IMAI M.; HATTA Y.; WATANABE S.; LI C.; YAMADA S.; FUJII K.; MURAKAMI S.; IMAI H.; KAKUGAWA S.; ITO M.; TAKANO R.; IWATSUKI-HORIMOTO K.; SHIMOJIMA M.; HORIMOTO T.; GOTO H.; TAKAHASHI K.; MAKINO A.; ISHIGAKI H.; NAKAYAMA M.; OKAMATSU M.; TAKAHASHI K.; WARSHAUER D.; SHULT PA.; SAITO R.; SUZUKI H.; FURUTA Y.; YAMASHITA M.; MITAMURA K.; NAKANO K.; NAKAMURA M.; BROCKMAN-SCHNEIDER R.; MITAMURA H.; YAMAZAKI M.; SUGAYA N.; SURESH M.; OZAWA M.; NEUMANN G.; GERN J.; KIDA H.; OGASAWARA K.; KAWAOKA Y. (2009). In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature.* 20;460(7258):1021-5. doi: 10.1038/nature08260. PMID: 19672242; PMCID: PMC2748827.

JAIN A.; PRAKASH S.; JAIN B. (2017). Changes in Hemagglutinin and Neuraminidase Genes of pH1N1 Influenza Virus Strains Collected from a North Indian Tertiary Care Hospital during 2015. *Intervirology.* 60(6):263-270. doi: 10.1159/000489632

JONES S.; NELSON-SATHI S.; WANG Y.; PRASAD R.; RAYEN S.; NANDEL V.; HU Y.; ZHANG W.; NAIR R.; DHARMASEELAN S.; CHIRUNDODH D.V.; KUMAR R.; PILLAI R.M. (2019). Evolutionary, genetic, structural characterization and its functional implications for the influenza A (H1N1) infection outbreak in India from 2009 to 2017. *Sci Rep.* 11;9(1):14690. doi: 10.1038/s41598-019-51097-w.

JOSHI N. A.; FASS J. N. (2011). Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at https://github.com/najoshi/sickle.

JUREKA A.S.; KLEINPETER A.B.; TIPPER J.L.; HARROD K.S.; PETIT C.M. (2019). The influenza NS1 protein modulates RIG-I activation via a strain-specific direct interaction with the second CARD of RIG-I. *J Biol Chem.* pii: jbc.RA119.011410. doi: 10.1074/jbc.RA119.011410. [Epub ahead of print]

KALTHOFF D.; BEER M.; HOFFMANN B. (2013). High resolution melting analysis: rapid and precise characterisation of recombinant influenza A genomes. *J. Virol*. 10:284. doi: 10.1186/1743-422X-10-284.

KELLER, M.W.; RAMBO-MARTIN, B.L.; WILSON, M.M.; RIDENOUR, C.A.; SHEPARD, S.S.; STARK, T.J.; NEUHAUS, E.B.; DUGAN, V.G.; WENTWORTH, D.E.; BARNES, J.R. (2018). Direct RNA Sequencing of the Coding Complete Influenza A Virus Genome. Sci. Rep. 8, 14408.

KILBOURNE E. (2006). Influenza Pandemics of the 20th century. *Emergen Infect Dis.* 12(1):9-14.

KIM W.J.; HUR K.Y.; PARK H.W.; LEE S.W.; YOO J.Y. (2019) Pathogenicity of the H1N1 influenza virus enhanced by functional synergy between the NPV100I and NAD248N pair. *PLoS ONE* 14(5): e0217691. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217691

KOMISSAROV A.; FADEEV A.; SERGEEVA M.; PETROV S.; SINTSOVA K.; EGOROVA A.; PISAREVA M.; BUZITSKAYA Z.; MUSAEVA T.; DANILENKO D.; KONOVALOVA N.; PETROVA P.; STOLYAROV K.; SMORODINTSEVA E.; BURTSEVA E.; KRASNOSLOBODTSEV K.; KIRILLOVA E.; KARPOVA L.; EROPKIN M.; SOMININA A.; GRUDININ M. (2016). Rapid spread of influenza A(H1N1)pdm09 viruses with a new set of specific mutations in the internal genes in the beginning of 2015/2016 epidemic season in Moscow and Saint Petersburg (Russian Federation).

Influenza Other Respir Viruses. 10(4):247-53. doi: 10.1111/irv.12389. Epub 2016 May 27.

KUFAREVA I.; ABAGYAN R. (2012). Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol.* 857: 231–257. doi:10.1007/978-1-61779-588-6_10.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7), 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054.

LAGUNA-TORRES V.A.; SÁNCHEZ-LARGAESPADA J.F.; LORENZANA I.; FORSHEY B.; AGUILAR P.; JIMENEZ M.; PARRALES E.; RODRIGUEZ F.; GARCÍA J.; JIMENEZ I.; RIVERA M.; PEREZ J.; SOVERO M.; RIOS J.; GAMERO M.E.; HALSEY E.S.; KOCHEL T.J. (2011). Influenza and other respiratory viruses in three Central American countries. *Influenza Other Respir Viruses.* 5(2):123-34. doi: 10.1111/j.1750-2659.2010.00182.x. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21306576; PMCID: PMC4942008.

LAOHPONGSPAISAN C.; RUNGROTMONGKOL T.; INTHARATHEP P.; MALAISREE M.; DECHA P.; ARUKSAKUNWONG O.; SOMPORNPISUT P.; HANNONGBUA S. (2009). Why amantadine loses its function in influenza m2 mutants: MD simulations. *J Chem Inf Model.* 49(4):847-52. doi: 10.1021/ci800267a. PMID: 19281265.

LEE DH. (2020). Complete Genome Sequencing of Influenza A Viruses Using Next-Generation Sequencing. Methods Mol Biol. 2123:69-79. doi: 10.1007/978-1-0716-0346-8_6. PMID: 32170681.

LE, L.; LELUK, J. (2011). Study on phylogenetic relationships, variability, and correlated mutations in M2 proteins of influenza virus A. *PloS one*, *6*(8), e22970. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022970

LE Q.M.; WERTHEIM H.F.; TRAN N.D.; VAN DOORN H.R.; NGUYEN T.H.; HORBY P. (2009). Un grupo comunitario de los casos resistentes al oseltamivir de la influenza H1N1 2009. *N Engl J Med.* 2010; 362: 86-7

LI H.; DURBIN R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 25: 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324

LI H.; HANDSAKER B.; WYSOKER A.; FENNELL T.; RUAN J.; HOMER N.; MARTH G.; ABECASIS G.; DURBIN R.; 1000 GENOME PROJECT DATA PROCESSING SUBGROUP. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics (Oxford, England), 25(16), 2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352.

LI H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics (Oxford, England), 27(21), 2987–2993. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509

LI P.; LO C.; ANDERSON J.; DAVENPORT K.; BISHOP-LILLY K.; XU Y.; AHMED S.; FENG S.; MOKASHI V.; CHAIN P. (2017). Enabling the democratization of the genomics revolution with a fully integrated web-based bioinformatics platform. *Nucleic acids research*, *45*(1), 67–80. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1027

LI X.; KONG M.; CHEN J.; SU X.; ZOU M.; GUO L.; LI L.; DING J. (2013). Epidemiology and full genome sequence analysis of H1N1pdm09 from Northeast China. *Virus Genes.* 47(2):199-209. doi: 10.1007/s11262-013-0931-1. Epub 2013 Jun 15. PMID: 23771788.

LIN J.H.; TSENG C.P.; CHEN Y.J.; LIN C.Y.; CHANG S.S.; WU H.S.; CHENG J.C. (2008). Rapid Differentiation of Influenza A Virus Subtypes and Genetic Screening for Virus Variants by High-Resolution Melting Analysis. *J Clin Microbiol*. 46(3), 1090–7. http://doi.org/10.1128/JCM.02015-07

LIU J.; GONG L.F.; XU Y.C.; SUN Z.L.; GAO Q.; DONG Z.J. (2019). Genetic and antigenic characterization of influenza A(H1N1)pdm09 in Yantai, China, during the 2009-2017 influenza season. *J Med Virol.* 91(3):351-360. doi: 10.1002/jmv.25328. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30267587.

LIU S.S.; JIAO X.Y.; WANG S.; SU W.Z.; JIANG L.Z.; ZHANG X.; KE C.W.; XIONG P. (2017). Susceptibility of influenza A(H1N1)/pdm2009, seasonal A(H3N2) and B viruses to Oseltamivir in Guangdong, China between 2009 and 2014. *Sci Rep.* 16;7(1):8488. doi: 10.1038/s41598-017-08282-6.

LIU W.C.; LIN C.Y.; TSOU Y.T.; JAN J.T.; WU S.C. (2015). Cross-Reactive Neuraminidase-Inhibiting Antibodies Elicited by Immunization with Recombinant Neuraminidase Proteins of H5N1 and Pandemic H1N1 Influenza A Viruses. *J Virol.* 89(14):7224-34. doi: 10.1128/JVI.00585-15. Epub 2015 May 6.

LIU Y.; YANG Y.; FAN J.; HE R.; LUO M.; ZHENG X. (2015). The Crystal Structure of the PB2 Cap-binding Domain of Influenza B Virus Reveals a Novel Cap Recognition Mechanism. *J Biol Chem.* 3;290(14):9141-9. doi: 10.1074/jbc.M115.636464. Epub 2015 Feb 17.

MARTINEZ O.; TSIBANE T.; BASLER C.F. (2009). Neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies: therapeutics and tools for discovery. *Int Rev Immunol.* 28(1):69-92. doi: 10.1080/08830180802593540. PMID: 19241254.

MASOUDIAN A.; SHEIKHI N.; BOZORGMEHRI-FARD M. (2018). Identification of new avian Infectious Bronchitis virus variants in Iranian poultry flocks by High Resolution Melting curve analysis. *J Hellenic Vet Med Soc.* 69(1): 783-790.

MCDONALD N.J.; SMITH C.B.; COX N.J. (2007). Antigenic drift in the evolution of H1N1 Influeza A viruses resulting from deletion of a single amino acid in the haemagglutinin gene. *J. Gen Virol.* 88:3209-3213

MENA I.; NELSON M.; QUEZADA-MONROY F.; DUTTA J.; CORTES-FERNÁNDEZ R.; LARA-PUENTE J.; CASTRO-PERALTA F.; CUNHA L.; TROVÃO N.; LOZANO-DUBERNARD B.; RAMBAUT A.; BAKEL A.; GARCÍA-SASTRE A. (2016) Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico *eLife* 5:e16777.

MENDEL D.B.; TAI C.Y.; ESCARPE P.A.; LI W.; SIDWELL R.W.; HUFFMAN J.H.; SWEET C.; JAKEMAN K.J.; MERSON J.; LACY S.A.; LEW W.; WILLIAMS M.A.; ZHANG L.; CHEN M.S.; BISCHOFBERGER N.; KIM C.U. (1998). Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(3):640-6. doi: 10.1128/AAC.42.3.640. PMID: 9517945; PMCID: PMC105511.

MERCK S.; DOHME E. S.A. (2005). Infecciones víricas. Manual Merck de información médica para el hogar. Capítulo 186.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA USA; IEEE: New Orleans, LA, USA, 2010; pp. 1–8

MINISTERIO DE SALUD – PERÚ (2016). Influenza en semana epidemiológica 23. En boletín epidemiológico (Arequipa). 12:305-317. Recuperado de: https://www.saludarequipa.gob.pe/epidemiologia/bole_epi/2016/Bolet_23.pdf

MINISTERIO DE SALUD – PERÚ (2016). Situación actual de la circulación del virus influenza en el Perú – 2016 en semana epidemiológica 45. En boletín epidemiológico (Lima). 25 (45): 993 – 994. Recuperado de: https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2016/45.pdf

MOASSER E.; BEHZADIAN F.; MOATTARI A.; FOTOUHI F.; ZARAKET H. (2018). Characterization of the neuraminidase genes from human influenza A viruses circulating in Iran from 2010 to 2015. *Arch Virol.* 163(2):391-400. doi: 10.1007/s00705-017-3603-y. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29086107.

NABAKOOZA G.; PASTUSIAK A.; KATEETE D. P.; LUTWAMA J. J.; KITAYIMBWA J. M.; FROST S. (2022). Whole-genome analysis to determine the rate and patterns of intra-subtype reassortment among influenza type-A viruses in Africa. Virus evolution, 8(1), veac005. https://doi.org/10.1093/ve/veac005

NATIONAL INFLUENZA CENTER, FIOCRUZ (NIC-Fiocruz). (2019). Surveillance report Influenza Virus Characterization, annual report-epidemiological week 40/2018 to 36/2019.

NELSON M.; SPIRO D.; WENTWORTH D.; BECK E.; FAN J.; GHEDIN E.; HALPIN R.; BERA J.; HINE E.; PROUDFOOT K.; STOCKWELL T.; LIN X.; GRIESEMER S.; KUMAR S.; BOSE M.; VIBOUD C.; HOLMES E.; HENRICKSON K. (2009). The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Curr.* 3;1:RRN1126.. http://dx.doi.org/10.1371/currents.RRN1126.

NELSON M.; SPIRO D.; WENTWORTH D.; FAN J.; BECK E.; ST. GEORGE K.; HENRICKSON K. (2009). The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS*. Currents, 1, RRN1126. http://doi.org/10.1371/currents.RRN1126

NOGALES A.; MARTINEZ-SOBRIDO L.; CHIEM K.; TOPHAM D.J.; DEDIEGO M.L. (2018). Functional Evolution of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus NS1 and PA in Humans. *J Virol.* 12;92(19). pii: e01206-18. doi: 10.1128/JVI.01206-18.

NOVEL SWINE-ORIGIN INFLUENZA A (H1N1) VIRUS INVESTIGATION TEAM. 2009. Emergence of a novel swine origin influenza A (H1N1) virus in humans. N. Engl. J. Med. 360**:**2605-2615

OLIVEIRA M.J.; MOTTA FDO C.; SIQUEIRA M.M.; RESENDE P.C.; BORN PDA S.; SOUZA T.M.; MESQUITA M.; OLIVEIRA MDE L.; CARNEY S.; MELLO W.A.; MAGALHÃES V. (2014). Molecular findings from influenza A(H1N1)pdm09 detected in patients from a Brazilian equatorial region during the pandemic period. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109(7):912-7. doi: 10.1590/0074-0276140210. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25410995; PMCID: PMC4296496.

OWUOR D.; NGOI J.; OTIENO J.; OTIENO G.; NYASIMI F.; NYIRO J.; AGOTI C.; CHAVES S.; NOKES D. (2020). Genetic characterization of influenza A(H3N2) viruses circulating in coastal Kenya, 2009-2017. Influenza Other Respir Viruses. May;14(3):320-330. doi: 10.1111/irv.12717. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31943817; PMCID: PMC7182596.

PADILLA C, CONDORI F, HUARINGA M, MARCOS P, ROJAS N, GUTIERREZ V, CÁCERES O. (2014). Full genome analysis of influenza A(H1N1)pdm09 virus isolated from Peru, 2013. *Genome Announc.* 2(2):e00191-14. doi:10.1128/genomeA.00191-14.

PALESE, P. (2004). Influenza: old and new threats. *Nat Medicine.* 10(12 Suppl):S82-7

POTDAR V.A.; CHADHA M.S.; JADHAV S.M.; MULLICK J.; CHERIAN S.S.; MISHRA A.C. (2010). Genetic characterization of the influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus isolates from India. *PLoS One* 5:e9693. doi:10.1371/journal.pone.00 09693.

QUIÑONES-MATEU M. E.; AVILA S.; REYES-TERAN G.; MARTINEZ M. A. (2014). Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. Journal of clinical

virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 61(1), 9–19. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.013.

RABADAN R.; ROBINS H. (2008). Evolution of the influenza a virus: some new advances. *Evol Bioinform Online.* 30;3:299-307. PMID: 19430605; PMCID: PMC2674800.

ROBINSON J. T.; THORVALDSDÓTTIR H.; WINCKLER W.; GUTTMAN M.; LANDER E. S.; GETZ G.; MESIROV J. P. (2011). Integrative genomics viewer. Nature biotechnology, 29(1), 24–26. https://doi.org/10.1038/nbt.1754.

ROVID S.A. (2016). Influenza. The Center for food security and public health. Iowa State University. Technical Fact sheet. .1-46. Recuperado de: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/influenza.pdf

RAMBAUT A.; DRUMMOND A. J.; XIE D.; BAELE G.; SUCHARD M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. Systematic Biology, 67(5), 901–904. https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032.

SALAZAR M.I.; LÓPEZ-ORTEGA O.; LEÓN-ÁVILA G.; RAMÍREZ-GONZÁLEZ J.E.; CASTRO-MUSSOT M.E. (2010). El origen de la variabilidad genética de los virus de influenza. *Gac Méd Méx.* 146 (3):199-207.

SAXENA S.; MISHRA N.; SAXENA R.; ARVINDA M.L.; SAHGAL P.; SAXENA S.; TIWARI S.; MATHUR A.; NAIR M. (2010). Structural and antigenic variance between novel influenza A/H1N1/2009 and influenza A/H1N1/2008 viruses. *J Infect Dev Ctries* 4(1):001-006.

SHEPARD S.; MENO S.; BAHL J.; WILSON M.; BARNES J.; NEUHAUS E. (2016). Viral deep sequencing needs an adaptive approach: IRMA, the iterative refinement meta-assembler. BMC Genom. 17:708.

SHEPARD S.; DAVIS C.; BAHL J.; RIVAILLER P.; YORK I.; DONIS R. (2014) LABEL: fast and accurate lineage assignment with assessment of H5N1 and H9N2 influenza A hemagglutinins. PLoS ONE. 9(1):e86921

SHOLTISSEK C.; VON HOYNINGEN V.; ROTT R. (1978). Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1). *Virology.* 89(2):613-7. doi: 10.1016/0042-6822(78)90203-9. PMID: 716220.

SOTO A. (2012). Ensayos clínicos y salud pública en el Perú: reconciliando un innecesario divorcio [Clinical trials and public health in Peru: reconciling an unnecessary divorce]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 29(4):429-30. Spanish. doi: 10.1590/s1726-46342012000400002. PMID: 23338625.

STAMATAKIS A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22:2688–2690. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446

STEINHAUER D.A.; SKEHEL J.J. (2002). Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet.* 36:305-32. doi: 10.1146/annurev.genet.36.052402.152757. Epub 2002 Jun 11. PMID: 12429695.

SUÁREZ LUIS. (2018). Situación de la Influenza en el Perú. Lima, Perú. Centro Nacional de Epidemiología Prevención y Control de Enfermedades. Recuperado de: http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2018/SE042018/04.pdf

SUÁREZ-OGNIO L, ARRASCO J, GÓMEZ J, MUNAYCO C.; VILCHEZ A.; CABEZAS C.; LAGUNA-TORRES V. (2011). Mortalidad relacionada a influenza A(H1N1) durante la pandemia en el Perú, 2009-2010 *Rev. Perú epidemiol*. 15(1): 24-30.

TAKAYAMA I.; NGUYEN BG.; DAO CX.; PHAM TT.; DANG TQ.; TRUONG PT.; DO TV.; PHAM TTP.; FUJISAKI S.; ODAGIRI T.; HASEGAWA H.; NAKAJIMA N. (2021). Next-generation sequencing analysis of the within-host genetic diversity of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in the upper and lower respiratory tracts of patients with severe influenza. mSphere 6:e01043-20. https://doi .org/10.1128/mSphere.01043-20

TAKASHITA E.; KISO M.; FUJISAKI S.; YOKOYAMA M.; NAKAMURA K.; SHIRAKURA M.; SATO H.; ODAGIRI T.; KAWAOKA Y.; TASHIRO M. (2015). Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(5):2607-17. doi: 10.1128/AAC.04836-14. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25691635; PMCID: PMC4394804.

TALAVERA G.; CASTRESANA J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Systematic biology, 56(4), 564–577. https://doi.org/10.1080/10635150701472164.

TALLEDO M.; ZUMAETA K. (2009). Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Rev Peru Biol.* 16(2):227-38.

TONG S.Y.; GIFFARD P.M. (2012). Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol.* 50(11):3418-21. doi: 10.1128/JCM.01709-12. Epub 2012 Aug 8.

TSIATIS A.C.; NORRIS-KIRBY A.; RICH R.G.; HAFEZ M.J.; GOCKE C.D.; ESHLEMAN J.R.; MURPHY K.M. (2010). Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn.* 12(4):425-32. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090188. Epub 2010 Apr 29. PMID: 20431034; PMCID: PMC2893626.

VAN POELVOORDE L.; BOGAERTS B., FU, Q.; DE KEERSMAECKER S.; THOMAS I.; VAN GOETHEM N.; VAN GUCHT S.; WINAND R.; SAELENS X.; ROOSENS N.; VANNESTE K. (2021). Whole-genome-based phylogenomic analysis of the Belgian 2016-2017 influenza A(H3N2) outbreak season allows improved surveillance. Microbial genomics, 7(9), 000643. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000643

VARILLAS D.; BERMEJO-MARTIN J.F.; ALMANSA R.; ROJO S.; NOGUEIRA B.; EIROS J.M.; RICO L.; IGLESIAS V.; DE LEJARAZU R.O. (2011). A new method for detection of pandemic influenza virus using High Resolution Melting analysis of the neuraminidase gene. *J Virol Methods.* 171(1):284-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.10.003. Epub 2010 Oct 15. PMID: 20951745.

VIBOUD C.; ALONSO W.J.; SIMONSEN L. (2006). Influenza in tropical regions. *PLoS Med*. 3(4):e89. doi: 10.1371/journal.pmed.0030089. Epub 2006 Mar 7. PMID: 16509764; PMCID: PMC1391975.

VOSKARIDES K.; CHRISTAKI E.; NIKOLOPOULOS G.K. (2018). Influenza Virus-Host Co-evolution. A Predator-Prey Relationship? *Front Immunol*. 7(9). doi: 10.3389/fimmu.2018.02017. PMID: 30245689; PMCID: PMC6137132.

WILSON I.A.; COX N.J. (1990). Structural basis of immune recognition of Influeza virus hemagglutinin. *Ann Rev Immunol*. 8:737–771.

WANG S.; LI W.; LIU S.; XU, J. (2016). RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. Nucleic acids research, 44(W1), W430–W435. https://doi.org/10.1093/nar/gkw306

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010). WHO guidelines for pharmacological management of pandemic influenza A(H1N1) 2009 and other influenza viruses. World Health Organization. Geneva, Switzerland. Recuperado de: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2021). Influenza Laboratory Surveillance Information by the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). FluNet. Recuperado de: https://apps.who.int/flumart/Default?ReportNo=7

WRIGHT P.; NEUMANN G.; KAWAOKA Y. (2007) Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5 ed. Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Business. 1691–1740.

WRIGHT P.; NEUMANN G.; KAWAOKA Y. (2013). "Orthomyxoviruses". In Fields Virology, eds B. N. Fields, D. M. Knipe and Howley (Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins), 1186-1243.

ZHAO M.; LEE W.; GARRISON E.; MARTH G. (2013). SSW library: an SIMD Smith-Waterman C/C++ library for use in genomic applications. PLoS ONE. 8(12):e82138

ZHAO J.; LIU J.; VEMULA S. V.; LIN C.; TAN J.; RAGUPATHY V.; WANG X.; MBONDJI-WONJE C.; YE Z.; LANDRY M. L.; HEWLETT I. (2016). Sensitive Detection and Simultaneous Discrimination of Influenza A and B Viruses in Nasopharyngeal Swabs in a Single Assay Using Next-Generation Sequencing-Based Diagnostics. PloS one, 11(9), e0163175. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163175

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. *J Virol.* 83(19):10309-13. doi: 10.1128/JVI.01109-09.

X. ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 20. Genotipos más frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 del Perú durante el año 2015, mediante la técnica de HRM para el gen de hemaglutinina y de la Matriz.

No.	Muestra	Departamento	GEN HEMAGLUTININA				GEN DE LA MATRIZ				Genotipo Global	Sexo	EDAD	GRUPO ETARIO	COMPLICACION
			Código	Ct	Genotipo HA	Confianza %	Código	Ct	Genotipo M	Confianza %					
1	INS031872715	LIMA	HA-1	25.6	B	100	M-1	21.63	B	97.7	V	M	0.1	Menor de 5 años	IRAG
2	INS040145015	ANCASH	HA-2	24.76	A	100	M-2	22.66	B	82.89	II	M	0.4	Menor de 5 años	IRAG
3	INS040271815	CUSCO	HA-3	20.44	A	100	M-3	25.15	B	84.99	II	M	1.7	Menor de 5 años	IRAG
4	INS050128015	CAJAMARCA	HA-4	26.66	A	100	M-4	26.17	B	92.46	II	F	3.4	Menor de 5 años	ETI
5	INS050279015	LAMBAYEQUE	HA-5	20.71	A	100	M-5	24.99	B	94.83	II	F	9.1	5 a 11 años	ETI
6	INS052068215	LA LIBERTAD	HA-6	23.52	A	88.53	M-6	23.92	B	95.91	II	F	9.6	5 a 11 años	IRAG
7	INS052636315	LAMBAYEQUE	HA-7	22.41	A	100	M-7	22.34	B	94.17	II	M	22.8	18 a 60 años	ETI
8	INS052638015	LA LIBERTAD	HA-8	22.92	A	100	M-8	17.78	A	74.33	I	M	23.9	18 a 60 años	IRAG
9	INS052640615	LAMBAYEQUE	HA-9	28.56	A	100	M-9	22.69	A	100	I	M	26.5	18 a 60 años	IRAG
10	INS052641015	LAMBAYEQUE	HA-10	22.75	A	100	M-10	18.26	A	100	I	F	28.4	18 a 60 años	IRAG

11	INS052641915	LIMA	HA-11	21.78	A	89.68	M-11	24.32	A	91.31	I	M	32.3	18 a 60 años	IRAG
12	INS052647015	LA LIBERTAD	HA-12	23.7	A	89.95	M-12	17.99	A	98.33	I	F	36.3	18 a 60 años	ETI
13	INS052651415	LAMBAYEQUE	HA-13	22.73	A	100	M-13	17.87	A	97.51	I	F	37.2	18 a 60 años	IRAG
14	INS052681815	CUSCO	HA-14	23.07	A	74.22	M-14	19.9	B	92.38	II	M	37.9	18 a 60 años	IRAG
15	INS052682315	CUSCO	HA-15	23.56	A	83.75	M-15	25.32	B	100	II	M	38.8	18 a 60 años	IRAG
16	INS052682515	CUSCO	HA-16	21.94	A	88.41	M-16	25.01	B	89.03	II	M	40.1	18 a 60 años	ETI
17	INS052682615	CUSCO	HA-17	23.39	A	93.23	M-17	26.12	B	100	II	F	41.2	18 a 60 años	IRAG
18	INS052682715	CUSCO	HA-18	21.1	A	74.89	M-18	25.93	A	100	I	M	41.4	18 a 60 años	IRAG
19	INS052682815	CUSCO	HA-19	22.87	A	90.73	M-19	21.17	A	87.02	I	M	45.2	18 a 60 años	IRAG
20	INS052682915	CUSCO	HA-20	22.28	A	92.36	M-20	25.29	B	79.39	II	F	47.5	18 a 60 años	IRAG
21	INS052683015	CUSCO	HA-21	20.94	A	96.92	M-21	24.02	A	86.1	I	F	48.7	18 a 60 años	ETI
22	INS054622115	LAMBAYEQUE	HA-22	22.53	A	100	M-22	22.4	A	100	I	F	49.0	18 a 60 años	ETI
23	INS054651615	LA LIBERTAD	HA-23	24.48	A	85.58	M-23	22.33	A	100	I	M	49.2	18 a 60 años	IRAG
24	INS054656915	LAMBAYEQUE	HA-24	22.46	A	88.22	M-24	18.26	A	94.18	I	F	50.4	18 a 60 años	IRAG
25	INS060372615	HUANCAVELICA	HA-25	21.65	A	100	M-25	25.15	A	100	I	F	52.3	18 a 60 años	IRAG

26	INS060375515	CAJAMARCA	HA-26	22.88	A	82.7	M-26	25.96	A	100	I	F	55.3	18 a 60 años	IRAG
27	INS060401515	LA LIBERTAD	HA-27	22.61	A	84.89	M-27	21.54	A	84.06	I	M	72.8	mayor de 60 años	ETI
28	INS061100115	HUANCAVELICA	HA-28	20.89	A	100	M-28	18.44	B	100	II	M	73.3	mayor de 60 años	IRAG
29	INS061106315	LIMA	HA-29	22.33	A	78.28	M-29	27.1	B	100	II	M	79.0	mayor de 60 años	IRAG
30	LIMAM1506006	LIMA	HA-30	22.26	A	85.04	M-30	19.7	B	100	II	M	79.6	mayor de 60 años	IRAG
31	LIMAM1507831	LIMA	HA-31	23.99	A	89.68	M-31	23.23	B	72.62	II	F	84.3	mayor de 60 años	IRAG

Tabla 21. Genotipos más frecuentes del virus influenza A(H1N1) pdm09 del Perú durante el año 2016, mediante la técnica de HRM para el gen de hemaglutinina y de la matriz

No.	Muestra	Departamento	GEN HEMAGLUTININA				GEN DE LA MATRIZ				Genotipo Global	Sexo	EDAD	GRUPO ETARIO	COMPLICACION
			Código	Ct	Genotipo HA	Confianza %	Código	Ct	Genotipo M	Confianza %					
1	INS040188816	PIURA	HA-1 2016	26.9	B	100	M-1 2016	22.39	B	91.69	V	F	5.2	5 a 11 años	ETI
2	INS040189016	TUMBES	HA-2 2016	29.93	A	79.87	M2-2016	28.36	B	100	II	F	8.9	5 a 11 años	ETI
3	INS040189616	TUMBES	HA-3 2016	27.19	A	82.31	M3-2016	29.89	B	82.95	II	M	4.3	Menor de 5 años	ETI
4	INS040189816	TUMBES	HA-4 2016	25.68	A	100	M4-2016	25.1	A	88.7	I	F	26.8	18 a 60 años	ETI
5	INS040190116	TUMBES	HA-5 2016	31.12	A	79.72	M5-2016	27.95	A	85.96	I	F	7.8	5 a 11 años	ETI
6	INS040220716	LIMA	HA-6 2016	25.81	A	90.24	M6-2016	27.5	B	86.15	II	M	ND	mayor de 60 años	IRAG INUSITADA
7	INS032977516	LA LIBERTAD	HA-7 2016	20.74	A	77.81	M7-2016	21.28	B	86.95	II	M	5.0	5 a 11 años	ETI
8	INS034107816	PIURA	HA-8 2016	26.74	A	100	M8-2016	24.54	B	95.35	II	F	2.3	Menor de 5 años	ETI
9	INS032978216	PIURA	HA-9 2016	20.68	A	88.88	M9-2016	21.92	B	90.32	II	F	34.9	18 a 60 años	ETI
10	INS032980016	LIMA	HA-10 2016	21.78	A	83.04	M10-2016	24.44	A	100	I	M	ND	mayor de 60 años	ETI

11	INS040199216	LAMBAYEQUE	HA-11 2016	27.94	A	91.03	M11-2016	29.94	A	100	I	M	6.0	5 a 11 años	IRAG
12	INS033821416	PIURA	HA-12 2016	26.2	A	89.9	M12-2016	26.58	B	91.94	II	F	14.4	12 a 18 años	ETI
13	INS030270116	LIMA	HA-13 2016	28.28	B	100	M13-2016	25.34	A	90.72	IV	F	29.2	18 a 60 años	ETI
14	INS033807016	LIMA	HA-14 2016	24.31	A	77.12	M14-2016	24.4	B	92.14	II	F	1.0	Menor de 5 años	ETI
15	INS033806316	LIMA	HA-15 2016	27.17	A	86.02	M15-2016	27.71	A	100	I	M	5.6	5 a 11 años	IRAG
16	INS034079316	PIURA	HA-16 2016	22.76	A	85.53	M16-2016	23	B	100	II	F	25.5	18 a 60 años	IRAG
17	INS034078716	PIURA	HA-17 2016	22.28	A	82.17	M17-2016	25.49	B	87.09	II	F	47.0	18 a 60 años	ETI
18	INS034078516	PIURA	HA-18 2016	23.26	A	88	M18-2016	23.97	B	95.69	II	F	57.4	18 a 60 años	ETI
19	INS060728116	PUNO	HA-19 2016	22.71	A	86.37	M19-2016	27.97	A	78.96	I	M	46.4	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
20	INS033822016	PIURA	HA-20 2016	27.11	A	100	M20-2016	22.92	B	81.22	II	F	34.9	18 a 60 años	ETI
21	INS033821916	PIURA	HA-21 2016	22.25	A	82.22	M21-2016	20.31	B	88.33	II	F	9.0	5 a 11 años	IRAG
22	INS033821816	PIURA	HA-22 2016	24.61	A	100	M22-2016	23	B	82.62	II	M	6.9	5 a 11 años	IRAG
23	INS034119716	TUMBES	HA-23 2016	25.86	A	100	M23-2016	22.24	B	100	II	F	16.6	12 a 18 años	IRAG
24	INS030659416	LIMA	HA-24 2016	24.86	A	76.83	M24-2016	30.81	B	100	II	M	49.1	18 a 60 años	IRAG

25	INS034119316	LA LIBERTAD	HA-25 2016	26.62	A	81.14	M25-2016	25.76	B	75.83	II	M	46.8	18 a 60 años	IRAG
26	INS040222316	MADRE DE DIOS	HA-26 2016	25.69	A	72.95	M26-2016	26.74	A	100	I	F	29.1	18 a 60 años	ETI
27	INS040187316	LIMA	HA-27 2016	23.49	A	72.13	M27-2016	19.75	B	94.54	II	F	57.2	18 a 60 años	IRAG
28	INS040177416	LIMA	HA-28 2016	29.61	A	79.3	M28-2016	29.17	B	96.53	II	M	31.6	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
29	INS040176816	LAMBAYEQUE	HA-29 2016	25.8	A	86.24	M29-2016	25.8	B	88.77	II	F	1.7	Menor de 5 años	ETI
30	INS040340916	LA LIBERTAD	HA-30 2016	28.95	A	82.09	M30-2016	26.47	B	98.41	II	F	1.5	Menor de 5 años	IRAG INUSITADA
31	INS040188216	PIURA	HA-31 2016	24.58	A	76.64	M31-2016	21.9	B	86.6	II	F	26.3	18 a 60 años	IRAG
32	INS040187216	LA LIBERTAD	HA-32 2016	24.7	A	88.24	M32-2016	29	A	100	I	F	34.0	18 a 60 años	IRAG
33	INS040223216	CAJAMARCA	HA-33 2016	23.27	A	85.83	M33-2016	25.02	B	82.57	II	M	36.2	18 a 60 años	ETI
34	INS040223316	CAJAMARCA	HA-34 2016	25.12	A	83.96	M34-2016	28.76	B	100	II	F	56.9	18 a 60 años	ETI
35	INS040223716	MADRE DE DIOS	HA-35 2016	27.5	A	85.3	M35-2016	30.84	B	88.94	II	M	45.7	18 a 60 años	ETI
36	INS040339416	LIMA	HA-36 2016	25.16	B	78.29	M36-2016	21.49	A	97.15	IV	F	71.6	mayor de 60 años	ETI
37	INS071641316	JUNIN	HA-37 2016	23.9	A	90.72	M37-2016	27.43	A	100	I	F	3.6	Menor de 5 años	IRAG INUSITADA

38	INS071656816	PUNO	HA-38 2016	32.83	A	100	M38-2016	30.56	B	76.32	II	M	0.7	Menor de 5 años	IRAG
39	INS071650316	CUSCO	HA-39 2016	26.49	A	76.4	M39-2016	24.37	B	76.06	II	M	41.0	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
40	INS071649916	AREQUIPA	HA-40 2016	22.46	A	90.25	M40-2016	27.13	A	73.81	I	M	63.5	mayor de 60 años	IRAG
41	INS071649816	PUNO	HA-41 2016	23.77	A	72.19	M41-2016	25.67	B	94.19	II	F	37.3	18 a 60 años	IRAG
42	INS071649416	AREQUIPA	HA-42 2016	26.52	A	74.81	M42-2016	29.08	A	100	I	M	63.9	mayor de 60 años	IRAG
43	INS071648116	AREQUIPA	HA-43 2016	30.13	A	100	M43-2016	28.5	B	84.86	II	F	62.6	mayor de 60 años	IRAG
44	INS071648016	AREQUIPA	HA-44 2016	25.79	A	78.78	M44-2016	25.43	B	100	II	F	37.6	18 a 60 años	IRAG
45	INS071647916	AREQUIPA	HA-45 2016	27.92	A	100	M45-2016	25.72	B	96.67	II	F	27.6	18 a 60 años	IRAG
46	INS071649216	AREQUIPA	HA-46 2016	25.79	A	91.36	M46-2016	25.62	B	70.76	II	F	9.5	5 a 11 años	IRAG
47	INS071647016	AREQUIPA	HA-47 2016	25.29	A	78	M47-2016	28.43	B	81.19	II	M	78.6	mayor de 60 años	IRAG
48	INS071646316	TACNA	HA-48 2016	21.84	A	100	M48-2016	28.3	B	75	II	F	1.8	Menor de 5 años	IRAG
49	INS071653316	MOQUEGUA	HA-49 2016	26.16	A	74.14	M49-2016	25.49	B	95.2	II	M	0.3	Menor de 5 años	ETI
50	INS070577616	AREQUIPA	HA-50 2016	26.27	A	100	M50-2016	25.27	B	89.85	II	M	2.0	Menor de 5 años	ETI
51	INS070577116	AREQUIPA	HA-51 2016	22.45	A	77.66	M51-2016	27.42	A	90.48	I	M	7.0	5 a 11 años	ETI

52	INS070577016	AREQUIPA	HA-52 2016	26.66	A	72.87	M52-2016	26.43	B	80.39	II	F	52.4	18 a 60 años	ETI
53	INS070576816	AREQUIPA	HA-53 2016	25.91	A	78.69	M53-2016	24.01	B	92.11	II	M	21.0	18 a 60 años	IRAG
54	INS070576716	AREQUIPA	HA-54 2016	24.21	A	74.11	M54-2016	25.56	B	100	II	F	42.5	18 a 60 años	IRAG
55	INS070563316	AREQUIPA	HA-55 2016	25.2	A	75.39	M55-2016	25.59	B	83.72	II	F	23.9	18 a 60 años	IRAG
56	INS070562516	AREQUIPA	HA-56 2016	24.69	A	77.21	M56-2016	25.53	B	82.18	II	F	36.6	18 a 60 años	IRAG
57	INS070562316	AREQUIPA	HA-57 2016	25.55	A	100	M-57 2016	28.98	B	74.7	II	F	56.6	18 a 60 años	IRAG
58	INS070562216	AREQUIPA	HA58-2016	23.67	A	100	M58-2016	23.74	A	84.37	I	M	2.3	Menor de 5 años	IRAG
59	INS070561616	AREQUIPA	HA59-2016	24.06	A	100	M59-2016	26.01	A	100	I	M	54.2	18 a 60 años	IRAG
60	INS070561516	AREQUIPA	HA60-2016	24.98	A	100	M60-2016	22.49	B	98.24	II	F	72.4	mayor de 60 años	IRAG
61	INS070560916	AREQUIPA	HA61-2016	27.93	A	100	M61-2016	28.03	B	100	II	M	47.4	18 a 60 años	IRAG
62	INS065489616	PUNO	HA62-2016	29.82	A	100	M62-2016	29.22	B	92.75	II	M	5.1	5 a 11 años	IRAG
63	INS070560516	SAN MARTIN	HA63-2016	24.51	A	100	M63-2016	26.98	A	100	I	M	30.8	18 a 60 años	IRAG
64	INS066193416	AREQUIPA	HA64-2016	24.13	A	89.86	M64-2016	29.19	B	100	II	F	46.2	18 a 60 años	IRAG
65	INS066193116	AREQUIPA	HA65-2016	23.48	A	100	M65-2016	19.14	B	93.19	II	M	37.6	18 a 60 años	IRAG
66	INS066192616	AREQUIPA	HA66-2016	23.12	A	73.68	M66-2016	24.52	B	79.11	II	F	4.3	Menor de 5 años	ETI

67	INS066195116	AREQUIPA	HA67-2016	29.74	A	100	M67-2016	25.63	B	77.71	II	M	36.4	18 a 60 años	IRAG
68	INS066195016	AREQUIPA	HA68-2016	25.95	B	100	M68-2016	22.41	B	98.67	V	F	30.6	18 a 60 años	IRAG
69	INS066192116	AREQUIPA	HA69-2016	26.46	A	73.54	M69-2016	21.7	B	87.52	II	M	33.4	18 a 60 años	IRAG
70	INS064901616	LIMA	HA70-2016	26.28	A	84.46	M70-2016	26.9	B	85.38	II	M	6.5	5 a 11 años	IRAG
71	INS064887416	AREQUIPA	HA71-2016	20.87	A	100	M71-2016	27.74	A	100	I	M	6.2	5 a 11 años	IRAG
72	INS062185516	LIMA	HA72-2016	19.83	A	75.61	M72-2016	24.37	B	100	II	M	3.2	Menor de 5 años	IRAG
73	INS042149816	LIMA	HA73-2016	22.91	A	100	M73-2016	27.96	B	100	II	M	68.4	mayor de 60 años	IRAG INUSITADA
74	INS043786716	UCAYALI	HA74-2016	26.39	A	100	M74-2016	24.57	B	96.03	II	M	6.1	5 a 11 años	ETI
75	INS043786816	UCAYALI	HA75-2016	22.19	A	100	M75-2016	19.21	B	96.23	II	F	29.6	18 a 60 años	IRAG
76	INS043795616	ICA	HA76-2016	30.36	A	100	M76-2016	23.59	B	96.06	II	F	40.3	18 a 60 años	IRAG
77	INS043791316	LIMA	HA77-2016	25.41	A	83.54	M77-2016	23.74	B	88.7	II	F	35.2	18 a 60 años	IRAG
78	INS043807116	AMAZONAS	HA78-2016	24.26	A	100	M78-2016	24.69	B	96.92	II	F	40.6	18 a 60 años	ETI
79	INS043808516	LAMBAYEQUE	HA79-2016	24.79	A	83.38	M79-2016	28.5	A	100	I	M	47.4	18 a 60 años	IRAG
80	INS043808616	LAMBAYEQUE	HA80-2016	25.07	A	87.67	M80-2016	22.69	B	84.18	II	F	24.1	18 a 60 años	IRAG

81	INS043821516	TUMBES	HA81-2016	28.2	A	72.89	M81-2016	26.38	A	85.35	I	F	9.0	5 a 11 años	ETI
82	INS043822116	LIMA	HA82-2016	40.97	A	100	M82-2016	40.88	A	100	I	F	50.8	18 a 60 años	ETI
83	INS043822316	LIMA	HA83-2016	34.16	A	100	M83-2016	28.79	A	87.43	I	F	35.3	18 a 60 años	ETI
84	INS042846116	JUNIN	HA84-2016	29.88	A	100	M84-2016	34.75	B	100	II	M	19.3	18 a 60 años	IRAG
85	INS043818816	PIURA	HA85-2016	30.94	B	100	M85-2016	22.08	A	91.47	IV	M	1.1	Menor de 5 años	IRAG INUSITADA
86	INS043819516	PIURA	HA86-2016	32.88	A	100	M86-2016	26.19	A	91.12	I	F	57.4	18 a 60 años	IRAG
87	INS045922216	AMAZONAS	HA87-2016	33.17	A	100	M87-2016	24.22	A	96.13	I	F	32.7	18 a 60 años	IRAG
88	INS044834216	LA LIBERTAD	HA88-2016	31.45	A	100	M88-2016	27.72	A	100	I	F	25.0	18 a 60 años	IRAG
89	INS045885716	TUMBES	HA89-2016	32.66	A	100	M89-2016	24.76	A	97.67	I	M	4.3	Menor de 5 años	ETI
90	INS045885916	TUMBES	HA90-2016	31.95	B	71.78	M90-2016	23.49	A	100	IV	F	5.5	5 a 11 años	ETI
91	INS045886016	TUMBES	HA91-2016	27.38	B	85.23	M91-2016	18.9	A	81.84	IV	M	13.0	12 a 18 años	ETI
92	INS045889216	ICA	HA92-2016	29.17	B	85.51	M92-2016	20.24	A	100	IV	M	ND	mayor de 60 años	ETI
93	INS050163416	PIURA	HA93-2016	30.49	A	100	M93-2016	29.91	A	100	I	F	24.0	18 a 60 años	IRAG INUSITADA

94	INS051057716	LA LIBERTAD	HA94-2016	30.41	A	100	M94-2016	29.78	A	93.74	I	F	2.8	Menor de 5 años	IRAG
95	INS051078016	PUNO	HA95-2016	32.72	A	100	M95-2016	31.59	B	100	II	F	55.1	18 a 60 años	IRAG
96	INS051059516	TUMBES	HA96-2016	36.78	B	100	M96-2016	28.98	A	95.72	IV	M	42.7	18 a 60 años	IRAG
97	INS051078216	LA LIBERTAD	HA97-2016	32.42	A	100	M97-2016	26.5	A	98.53	I	F	33.6	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
98	INS051078516	AYACUCHO	HA98-2016	34.86	A	100	M98-2016	31.59	A	81.46	I	F	2.0	Menor de 5 años	ETI
99	INS051078616	JUNIN	HA99-2016	27.77	B	100	M99-2016	19.86	A	87.75	IV	M	1.3	Menor de 5 años	ETI
100	INS051078816	LA LIBERTAD	HA100-2016	34.5	B	100	M100-2016	25.96	A	100	IV	F	41.4	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
101	INS051078916	LA LIBERTAD	HA101-2016	29.29	B	88.16	M101-2016	21.03	A	82.97	IV	F	8.8	5 a 11 años	IRAG
102	INS051119316	PIURA	HA102-2016	33.67	A	100	M102-2016	30.59	A	77.62	I	M	69.0	mayor de 60 años	IRAG
103	INS051119716	LA LIBERTAD	HA103-2016	33.31	B	100	M103-2016	27.67	A	87.65	IV	M	46.5	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
104	INS060705816	APURIMAC	HA104-2016	33.76	A	76.88	M104-2016	27.33	A	90.57	I	M	28.8	18 a 60 años	IRAG
105	INS064220016	AREQUIPA	HA105-2016	26.3	A	100	M105-2016	25.48	A	86.14	I	M	19.4	18 a 60 años	IRAG
106	INS032967316	LIMA	HA106-2016	30.53	A	100	M106-2016	29.88	A	90.55	I	F	48.5	18 a 60 años	ETI

107	INS030683416	CALLAO	HA107-2016	30.69	A	100	M107-2016	36.46	B	100	II	F	6.2	5 a 11 años	IRAG
108	INS030683716	LIMA	HA108-2016	33.26	B	70.74	M108-2016	25.22	A	83.76	IV	M	46.1	18 a 60 años	IRAG
109	ins071692016	AYACUCHO	HA109-2016	35.16	A	100	M109-2016	28.11	A	71.15	I	M	6.8	5 a 11 años	IRAG INUSITADA
110	INS032971216	PIURA	HA110-2016		A	100	M110-2016	40.16	A	100	I	F	36.5	18 a 60 años	ETI
111	INS030715116	PIURA	HA111-2016	27.38	A	71.67	M111-2016	25.24	A	98.55	I	F	57.7	18 a 60 años	ETI
112	INS030241316	LIMA	HA112-2016	30.4	A	100	M112-2016	31.21	A	81.7	I	F	47.5	18 a 60 años	IRAG
113	INS030242116	LIMA	HA113-2016	33.96	B	70.31	M113-2016	28.22	A	97.31	IV	F	0.4	Menor de 5 años	IRAG
114	INS030421816	LIMA	HA114-2016	27.57	A	75.34	M114-2016	24.19	A	98.6	I	F	56.9	18 a 60 años	IRAG
115	INS030242316	LIMA	HA115-2016	27.08	A	82.33	M115-2016	28.44	A	81.83	I	M	0.8	Menor de 5 años	IRAG
116	INS032963516	LIMA	HA116-2016	28.95	A	100	M116-2016	26.1	A	94.12	I	F	0.9	Menor de 5 años	IRAG
117	INS022339316	LIMA	HA117-2016	31.38	B	100	M117-2016	22.72	A	83.33	IV	M	1.5	Menor de 5 años	IRAG
118	INS021849016	PIURA	HA118-2016	29.46	B	100	M118-2016	20.2	A	100	IV	F	26.2	18 a 60 años	ETI
119	INS020243716	LIMA	HA119-2016	26.81	A	89.69	M119-2016	30.68	B	100	II	M	1.7	Menor de 5 años	IRAG
120	INS030692016	LIMA	HA120-2016	36.28	A	100	M120-2016	26.83	A	100	I	M	0.9	Menor de 5 años	IRAG

121	ins022537016	LIMA	HA121-2016	28.23	B	100	M121-2016	20.4	A	91.76	IV	F	7.3	5 a 11 años	ETI
122	INS022537116	LIMA	HA122-2016	27.26	A	79.65	M122-2016	24.22	A	100	I	F	ND	mayor de 60 años	ETI
123	INS022973016	LIMA	HA123-2016	31.83	A	100	M123-2016	28.95	A	100	I	M	1.5	Menor de 5 años	IRAG
124	INS020243816	LIMA	HA124-2016	33	B	100	M124-2016	25.48	A	84.96	IV	M	0.9	Menor de 5 años	IRAG
125	LIMAM1602386	LIMA	HA125-2016	28.26	B	100	M125-2016	20.43	A	85.06	IV	M	2.8	Menor de 5 años	ETI
126	INS023333316	LIMA	HA126-2016	28.31	A	84.82	M126-2016	31.65	B	100	II	F	41.1	18 a 60 años	IRAG
127	INS032971116	PIURA	HA127-2016	26.67	A	100	M127-2016	28.06	B	71.85	II	M	6.7	5 a 11 años	ETI
128	ins030694316	PIURA	HA128-2016	35.18	D	100	M128-2016	25.8	A	100	VIII	F	30.6	18 a 60 años	ETI
129	INS071694816	AREQUIPA	HA129-2016	35.9	B	100	M129-2016	27.73	A	97.59	IV	F	45.7	18 a 60 años	IRAG
130	INS071694916	AREQUIPA	HA130-2016	33.2	A	100	M130-2016	23.3	A	95.17	I	M	3.8	Menor de 5 años	IRAG
131	INS071695016	AREQUIPA	HA131-2016	35.19	A	100	M131-2016	20.83	A	87.58	I	M	56.9	18 a 60 años	IRAG
132	INS070795816	AREQUIPA	HA132-2016	31.07	B	100	M132-2016	24.57	A	98.87	IV	M	41.4	18 a 60 años	IRAG
133	INS073002916	AREQUIPA	HA133-2016	32.01	B	82.6	M133-2016	25.1	A	92.73	IV	F	41.3	18 a 60 años	IRAG
134	INS073003016	AREQUIPA	HA134-2016	30.32	A	85.04	M134-2016	22.89	A	72.83	I	M	3.3	Menor de 5 años	IRAG INUSITADA

135	INS073004116	AREQUIPA	HA135-2016	29.7	B	100	M135-2016	19.52	A	98.31	IV	M	9.0	5 a 11 años	IRAG INUSITADA
136	INS073004316	AREQUIPA	HA136-2016	25.36	B	90.98	M136-2016	19.71	A	95.77	IV	M	17.1	12 a 18 años	IRAG
137	INS080493816	AREQUIPA	HA137-2016	34.25	B	100	M137-2016	26.98	A	92.94	IV	M	40.9	18 a 60 años	ETI
138	INS080477716	PUNO	HA138-2016	33.62	A	100	M138-2016	28.18	A	90.09	I	F	1.9	Menor de 5 años	IRAG
139	INS080342216	AREQUIPA	HA139-2016	36.7	A	100	M139-2016	23.86	A	99.25	I	M	45.8	18 a 60 años	IRAG
140	INS080474916	LIMA	HA140-2016	35.79	A	100	M140-2016	28.79	A	100	I	F	32.1	18 a 60 años	ETI
141	INS080474416	TACNA	HA141-2016	33.95	B	86.12	M141-2016	21.2	A	96.66	IV	M	47.3	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
142	INS080474116	TACNA	HA142-2016	33.97	B	79.71	M142-2016	28.05	A	77.88	IV	M	53.4	18 a 60 años	IRAG
143	INS053028416	LA LIBERTAD	HA143-2016	30.05	B	92.01	M143-2016	20.16	A	89.76	IV	M	7.3	5 a 11 años	ETI
144	INS053608116	AREQUIPA	HA144-2016	33.96	A	100	M144-2016	36.14	C	100	III	M	4.3	Menor de 5 años	ETI
145	INS053609716	PUNO	HA145-2016	30.85	A	73.46	M145-2016	27.9	A	93.62	I	F	3.0	Menor de 5 años	IRAG
146	INS054257116	PUNO	HA146-2016	35.32	A	100	M146-2016	27.83	A	92.89	I	M	0.9	Menor de 5 años	IRAG
147	INS054256416	LIMA	HA147-2016	33.39	A	70.17	M147-2016	26.2	A	85.39	I	F	18.2	18 a 60 años	ETI

148	INS060599416	LIMA	HA148-2016	33.74	A	73.5	M148-2016	26.16	A	92.62	I	M	56.6	18 a 60 años	IRAG
149	INS060600416	AREQUIPA	HA149-2016	36.01	A	100	M149-2016	33.72	A	92.48	I	F	1.6	Menor de 5 años	ETI
150	INS063533516	PASCO	HA150-2016	27.91	D	76.48	M150-2016	28.14	B	100	IX	M	4.9	Menor de 5 años	ETI
151	INS062184016	AREQUIPA	HA151-2016	29.88	A	100	M151-2016	26.25	A	85.2	I	M	0.1	Menor de 5 años	IRAG
152	INS061224116	AREQUIPA	HA152-2016	34.02	A	100	M152-2016	26.03	A	95.61	I	M	66.5	mayor de 60 años	IRAG
153	INS061224216	AREQUIPA	HA153-2016		A	100	M153-2016	25.78	A	89.38	I	M	53.6	18 a 60 años	IRAG
154	INS061224416	AREQUIPA	HA154-2016	33.62	A	88.61	M154-2016	23.63	A	97.2	I	M	59.2	18 a 60 años	IRAG
155	INS064218316	CUSCO	HA155-2016	34.73	A	100	M155-2016	27.2	A	98	I	F	41.5	18 a 60 años	IRAG
156	INS064218416	AREQUIPA	HA156-2016	32.06	A	100	M156-2016	29.7	A	89.44	I	M	62.6	mayor de 60 años	IRAG
157	INS064219216	AREQUIPA	HA157-2016	25.69	A	82.68	M157-2016	25.48	A	83.83	I	M	38.1	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
158	INS063531016	PUNO	HA158-2016	28.22	A	85.73	M158-2016	26.76	A	77.01	I	M	0.1	Menor de 5 años	IRAG
159	INS064220216	AREQUIPA	HA159-2016	25.58	A	100	M159-2016	23.12	A	95.55	I	M	4.5	Menor de 5 años	IRAG
160	INS064220616	AREQUIPA	HA160-2016	26.8	A	80.96	M160-2016	27.85	A	92.28	I	M	5.9	5 a 11 años	ETI
161	INS064221116	AREQUIPA	HA161-2016	26.95	A	100	M161-2016	27.42	A	100	I	F	1.6	Menor de 5 años	ETI

162	INS064221216	AREQUIPA	HA162-2016	28.79	A	100	M162-2016	27.66	A	100	I	M	50.4	18 a 60 años	ETI
163	INS064221716	AREQUIPA	HA163-2016	30.17	A	100	M163-2016	28.92	A	100	I	M	6.2	5 a 11 años	IRAG INUSITADA
164	INS062182516	AREQUIPA	HA164-2016	30.87	A	86.82	M164-2016	35.58	A	100	I	M	7.0	5 a 11 años	IRAG
165	INS062182816	AREQUIPA	HA165-2016	29.02	A	100	M165-2016	29.54	A	100	I	M	51.1	18 a 60 años	IRAG
166	INS063534116	JUNIN	HA166-2016	29.03	A	75.65	M166-2016	33.54	A	100	I	M	38.6	18 a 60 años	IRAG
167	INS100271716	ANCASH	HA167-2016	29.86	A	90.27	M167-2016	28.1	A	93.57	I	M	66.9	mayor de 60 años	IRAG
168	INS051833816	LA LIBERTAD	HA168-2016	32.8	A	89.3	M168-2016	32.51	A	84.03	I	F	19.0	18 a 60 años	IRAG
169	INS054258616	LAMBAYEQUE	HA169-2016	30.66	B	74.34	M169-2016	26.46	A	100	IV	M	0.1	Menor de 5 años	IRAG
170	INS080714516	AREQUIPA	HA170-2016	32.67	A	90.69	M170-2016	33.98	A	98.38	I	M	84.4	mayor de 60 años	IRAG
171	ins081680816	LIMA	HA171-2016	28.39	B	100	M171-2016	27.87	A	79.34	IV	F	28.0	18 a 60 años	ETI
172	INS090229716	TACNA	HA172-2016	33.12	A	81.9	M172-2016	32.99	A	81.75	I	M	34.3	18 a 60 años	IRAG
173	INS090389616	LIMA	HA173-2016	31.75	A	89.99	M173-2016	35.3	B	100	II	F	56.5	18 a 60 años	IRAG
174	INS022536416	LIMA	HA174-2016	32.19	A	100	M174-2016	36.25	B	100	II	F	0.8	Menor de 5 años	IRAG
175	INS030427616	LIMA	HA175-2016	29.51	A	100	M175-2016	29.49	A	96.19	I	F	80.6	mayor de 60 años	ETI

176	INS030676616	PIURA	HA176-2016	32.22	A	100	M176-2016	32.2	A	81.66	I	F	6.4	5 a 11 años	ETI
177	INS032978916	PIURA	HA177-2016	29.83	A	80.79	M177-2016	28.37	A	94.7	I	M	7.8	5 a 11 años	ETI
178	INS033824316	LIMA	HA178-2016	31.02	A	100	M178-2016	31.75	B	100	II	F	6.2	5 a 11 años	ETI
179	INS033826116	PIURA	HA179-2016	31.61	A	78.75	M179-2016	37.9	A	100	I	F	36.2	18 a 60 años	ETI
180	INS033826416	LIMA	HA180-2016	32.2	A	86.87	M180-2016	31.75	A	86.74	I	F	58.2	18 a 60 años	IRAG
181	INS033826916	PIURA	HA181-2016	32.12	A	96.13	M181-2016	33.6	A	97.67	I	M	28.5	18 a 60 años	ETI
182	INS033827216	PIURA	HA182-2016	33.54	A	100	M182-2016	33.6	A	97.28	I	F	64.8	mayor de 60 años	ETI
183	INS033827416	PIURA	HA183-2016	29.63	B	78.11	M183-2016	27.76	A	80.46	IV	F	41.8	18 a 60 años	ETI
184	INS033827916	PIURA	HA184-2016	31.26	A	90.2	M184-2016	30.62	A	92.32	I	F	40.1	18 a 60 años	ETI
185	INS033828116	LAMBAYEQUE	HA185-2016	33.03	C	100	M185-2016	33.44	A	89.68	VI	F	4.1	Menor de 5 años	ETI
186	INS033828516	LIMA	HA186-2016	32.06	C	100	M186-2016	33.56	A	100	VI	M	39.2	18 a 60 años	ETI
187	INS033828816	PIURA	HA187-2016	33.12	C	100	M187-2016	33	B	100	VII	M	55.8	18 a 60 años	IRAG
188	INS033828916	PIURA	HA188-2016	32.44	C	86.28	M188-2016	35.19	B	100	VII	F	63.7	mayor de 60 años	IRAG
189	INS034132516	PIURA	HA189-2016	30.29	C	100	M189-2016	31.96	A	96.28	VI	F	6.3	5 a 11 años	ETI
190	INS034132616	PIURA	HA190-2016	33.54	A	100	M190-2016	33.39	A	93.93	I	M	3.6	Menor de 5 años	ETI

191	INS040162716	PIURA	HA191-2016	31.86	A	87.93	M191-2016	32.38	A	100	I	M	41.1	18 a 60 años	IRAG
192	INS040162816	APURIMAC	HA192-2016	31.05	A	96.89	M192-2016	31.23	A	100	I	F	2.5	Menor de 5 años	IRAG
193	INS040163116	LIMA	HA193-2016	31.73	A	100	M193-2016	36	B	100	II	M	0.7	Menor de 5 años	IRAG
194	INS040204116	PIURA	HA194-2016	31.22	A	100	M194-2016	30.1	A	89.81	I	F	45.0	18 a 60 años	ETI
195	INS040206816	PIURA	HA195-2016	32.29	A	94.63	M195-2016	32.15	A	100	I	M	55.2	18 a 60 años	ETI
196	INS040339416	LIMA	HA196-2016	27.48	A	100	M196-2016	26.56	A	100	I	F	71.6	mayor de 60 años	ETI
197	INS040340316	LIMA	HA197-2016	18.16	D	96.21	M197-2016	18.83	A	100	VIII	M	57.1	18 a 60 años	ETI
198	ins040342116	ANCASH	HA198-2016	18.87	C	100	M198-2016	19.43	A	100	VI	F	ND	mayor de 60 años	ETI
199	INS041728816	PIURA	HA199-2016	18.86	D	82.53	M199-2016	19.4	A	77.46	VIII	M	82.1	mayor de 60 años	ETI
200	INS041729416	PIURA	HA200-2016	20.12	D	78.88	M200-2016	20.4	B	80.08	IX	F	1.9	Menor de 5 años	ETI
201	INS041729516	PIURA	HA201-2016	18.56	D	96.07	M201-2016	19.53	A	81.28	VIII	F	27.0	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
202	INS042142116	PIURA	HA202-2016	19.28	D	81.07	M202-2016	20.04	A	86.15	VIII	F	31.6	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
203	INS042145116	LIMA	HA203-2016	18.79	C	100	M203-2016	19.8	A	100	VI	F	18.3	18 a 60 años	ETI

204	INS042759916	TUMBES	HA204-2016	19.22	D	90.34	M204-2016	19.78	A	80.34	VIII	M	0.7	Menor de 5 años	ETI
205	INS042769116	LIMA	HA205-2016	19.27	C	100	M205-2016	20	B	80.7	VII	F	29.0	18 a 60 años	IRAG
206	INS042773416	PIURA	HA206-2016	16.81	A	100	M206-2016	17.67	A	96.17	I	M	103.0	mayor de 60 años	IRAG
207	INS042775816	TUMBES	HA207-2016	17.43	D	78.47	M207-2016	18.48	A	85.04	VIII	M	5.5	5 a 11 años	IRAG
208	INS042776316	TUMBES	HA208-2016	19.54	D	87.76	M208-2016	19.76	A	76.14	VIII	F	1.3	Menor de 5 años	ETI
209	INS042776516	LAMBAYEQUE	HA209-2016	17.84	D	87.01	M209-2016	18.46	A	100	VIII	M	7.4	5 a 11 años	ETI
210	INS042777016	TUMBES	HA210-2016	17.67	D	83.37	M210-2016	18.01	A	92.94	VIII	M	0.7	Menor de 5 años	ETI
211	INS042783516	ANCASH	HA211-2016	17.92	C	100	M211-2016	18.53	B	100	VII	F	89.4	mayor de 60 años	IRAG INUSITADA
212	INS042796416	LIMA	HA212-2016	18.45	D	79	M212-2016	19.1	A	90.01	VIII	F	30.3	18 a 60 años	IRAG
213	INS043777316	PIURA	HA213-2016	17.71	D	98.63	M213-2016	17.82	A	94.83	VIII	F	31.7	18 a 60 años	IRAG
214	INS043778616	PIURA	HA214-2016	17.24	D	100	M214-2016	18.33	A	100	VIII	F	73.3	mayor de 60 años	IRAG
215	INS043778716	PIURA	HA215-2016	17.97	D	90.46	M215-2016	18.55	A	100	VIII	M	0.4	Menor de 5 años	IRAG INUSITADA
216	INS043784316	PIURA	HA216-2016	18.55	D	76.39	M216-2016	19.2	A	100	VIII	M	53.2	18 a 60 años	IRAG INUSITADA

217	INS043784916	AMAZONAS	HA217-2016	18.12	D	90.36	M217-2016	18.56	A	71.1	VIII	F	41.1	18 a 60 años	ETI
218	INS044118116	CAJAMARCA	HA218-2016	16.94	D	90.62	M218-2016	17.56	A	88.34	VIII	M	14.2	12 a 18 años	IRAG
219	INS044937016	LAMBAYEQUE	HA219-2016	16.91	D	91.37	M219-2016	17.54	A	76.89	VIII	F	39.8	18 a 60 años	IRAG
220	INS045902616	LA LIBERTAD	HA220-2016	18.7	D	100	M220-2016	18.75	A	100	VIII	M	29.9	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
221	INS052786216	LIMA	HA221-2016	17.71	D	71.12	M221-2016	18.33	A	100	VIII	F	18.9	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
222	INS053015216	LAMBAYEQUE	HA222-2016	18.31	D	100	M222-2016	19.14	A		VIII	M	29.5	18 a 60 años	ETI
223	INS053016816	LORETO	HA223-2016	17.59	D	97.88	M223-2016	19.43	C	100	X	F	19.4	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
224	INS053018716	LORETO	HA224-2016	17.62	D	84.3	M224-2016	18.54	A	100	VIII	F	54.8	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
225	INS053488016	AREQUIPA	HA225-2016	16.83	D	96.82	M225-2016	17.32	A	93.99	VIII	F	2.5	Menor de 5 años	IRAG
226	INS053488116	AREQUIPA	HA226-2016	16.78	D	89.76	M226-2016	17.04	C	100	X	F	4.4	Menor de 5 años	ETI
227	INS053759516	TACNA	HA227-2016	16.73	D	100	M227-2016	17.15	B	100	IX	M	45.8	18 a 60 años	IRAG
228	INS055322716	LA LIBERTAD	HA228-2016	17.77	D	83.53	M228-2016	18	B	100	IX	M	6.2	5 a 11 años	IRAG INUSITADA

229	INS060714016	PUNO	HA229-2016	17.87	D	73.9	M229-2016	17.63	A	100	VIII	M	35.0	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
230	INS060716716	CAJAMARCA	HA230-2016	17.89	D	100	M230-2016	18.11	A	100	VIII	M	0.8	Menor de 5 años	IRAG
231	INS060745316	ICA	HA231-2016	18.62	D	92.43	M231-2016	18.77	A	89.93	VIII	M	58.2	18 a 60 años	IRAG
232	INS061221916	AREQUIPA	HA232-2016	16.74	D	100	M232-2016	17.19	A	100	VIII	M	6.8	5 a 11 años	ETI
233	INS061222016	AREQUIPA	HA233-2016	19.62	D	94	M233-2016	21.19	A	74.61	VIII	F	4.9	Menor de 5 años	ETI
234	INS062182116	PUNO	HA234-2016	27.7	D	100	M234-2016	28.22	A	100	VIII	F	3.0	Menor de 5 años	IRAG
235	INS062183216	AREQUIPA	HA235-2016	20.36	D	85.22	M235-2016	20.34	A	77.66	VIII	M	35.1	18 a 60 años	IRAG
236	INS062183316	AREQUIPA	HA236-2016	18.51	D	96.54	M236-2016	19.23	B	87.83	IX	M	1.0	Menor de 5 años	IRAG
237	INS062184016	AREQUIPA	HA237-2016	19.49	C	100	M237-2016	19.82	B	100	VII	M	0.1	Menor de 5 años	IRAG
238	INS063533016	LIMA	HA238-2016	17.82	D	71.16	M238-2016	18.28	A	100	VIII	M	1.0	Menor de 5 años	IRAG
239	INS063534016	JUNIN	HA239-2016	21.1	D	92.13	M239-2016	20.6	A	85.87	VIII	F	40.4	18 a 60 años	IRAG
240	INS063550116	JUNIN	HA240-2016	20.32	C	100	M240-2016	20.68	A	72.26	VI	M	1.0	Menor de 5 años	IRAG INUSITADA
241	INS064218116	AREQUIPA	HA241-2016	20.4	D	87.08	M241-2016	20.69	B	100	IX	F	58.8	18 a 60 años	IRAG

242	INS064225816	HUANUCO	HA242-2016	20.5	D	82.12	M242-2016	20.68	A	80.04	VIII	M	56.7	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
243	INS064873116	JUNIN	HA243-2016	20.14	C	75.77	M243-2016	20.91	A	89.41	VI	M	3.3	Menor de 5 años	IRAG INUSITADA
244	INS064886816	AREQUIPA	HA244-2016	19.78	A	79.16	M244-2016	19.57	C	100	III	F	62.2	mayor de 60 años	IRAG
245	INS064887716	CAJAMARCA	HA245-2016	20.65	D	95.29	M245-2016	20.73	A	81.44	VIII	M	42.2	18 a 60 años	IRAG
246	INS064900616	PUNO	HA246-2016	19.33	C	100	M246-2016	20.52	B	90.15	VII	M	ND	mayor de 60 años	IRAG
247	INS072960016	AREQUIPA	HA247-2016	19.42	D	90.47	M247-2016	19.5	A	100	VIII	M	52.8	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
248	INS080349316	SAN MARTIN	HA248-2016	18.65	D	100	M248-2016	18.6	A	100	VIII	F	53.7	18 a 60 años	IRAG INUSITADA
249	INS080349916	AREQUIPA	HA249-2016	18.75	C	100	M249-2016	18.84	A	100	VI	M	8.6	5 a 11 años	ETI
250	INS091271016	LIMA	HA250-2016	20.1	D	88.64	M250-2016	20.51	A	84.21	VIII	M	8.0	5 a 11 años	IRAG INUSITADA
251	ins100053216	LIMA	HA251-2016	19.3	D	96.38	M251-2016	19.67	A	83.22	VIII	F	4.5	Menor de 5 años	ETI
252	INS100267016	HUANUCO	HA252-2016	20.68	D	91.21	M252-2016	20.47	A	91.85	VIII	M	68.6	mayor de 60 años	IRAG
253	INS110385016	PUNO	HA253-2016	21.06	D	86.03	M253-2016	20.3	A	86.11	VIII	F	53.6	18 a 60 años	IRAG

254	INS110385116	PUNO	HA254-2016	19.15	D	100	M254-2016	19.37	A	72.49	VIII	M	22.8	18 a 60 años	IRAG
255	INS113693716	LA LIBERTAD	HA255-2016	20.11	D	100	M255-2016	19.8	A	91.09	VIII	M	52.2	18 a 60 años	IRAG
256	LIMAM1602372	LIMA	HA256-2016	20.23	C	100	M256-2016	20.01	B	100	VII	M	1.5	Menor de 5 años	IRAG

Anexo 2.

Tabla 22. Genotipos más frecuentes del virus influenza a (H1N11) pdm09 del Perú durante los años 2015-2016, mediante la técnica de HRM para el gen de hemaglutinina y de la Matriz según departamentos del Perú.

DEPARTAMENTO	Genotipo Influenza A(H1N1)pdm09										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	TOTAL
Amazonas	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3
Áncash	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	4
Apurímac	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Arequipa	26	19	1	6	1	1	1	5	3	1	64
Ayacucho	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Callao	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cajamarca	1	3	0	0	0	0	0	3	0	0	7
Cusco	4	7	0	0	0	0	0	0	0	0	11
Huancavelica	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Huánuco	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
Ica	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	3
Junín	2	1	0	1	0	2	0	1	0	0	7
La Libertad	9	4	0	4	0	0	0	2	1	0	20
Lambayeque	7	4	0	1	0	1	0	3	0	0	16
Lima	19	18	0	9	1	2	2	6	0	0	57
Loreto	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
Ice de Tablas Madre de Dios	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Moquegua	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pasco	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Piura	16	11	0	3	1	1	2	8	1	0	43
Puno	5	4	0	0	0	0	1	4	0	0	14
San Martín	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Tacna	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0	5
Tumbes	4	3	0	3	0	0	0	4	0	0	14
Ucayali	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
TOTAL	103	84	2	30	3	8	7	42	6	2	287
Porcentaje	35.89	29.27	0.70	10.45	1.05	2.79	2.44	14.63	2.09	0.70	

Tabla 23. Frecuencia de genotipos frecuentes del virus influenza A(H1N1)pdm09 según grupo etario durante los años 2015-2016 por HRM.

EDAD	GENOTIPOS										TOTAL
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
Menor de 5 años	21	17	2	4	1	3	2	10	2	1	63
5-11 años	12	13	0	5	1	2	0	4	1	0	38
12-18 años	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0	5
18-59 años	56	43	0	14	1	2	2	24	2	1	145
Mayor de 60 años	14	9	0	2	0	1	3	3	1	0	33

Tabla 24. Frecuencia de genotipos frecuentes del virus influenza A (H1N1) pdm09 según sexo durante los años 2015-2016 por HRM

SEXO	GENOTIPO										TOTAL
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
FEMENINO	47	47	0	12	2	4	3	18	3	2	138
MASCULINO	56	37	2	18	1	4	4	24	3	0	149

Tabla 25. Frecuencia de genotipos frecuentes del virus influenza A (H1N1) pdm09 según clasificación cínica durante los años 2015-2016, por HRM.

CLASIFICACIÓN CLÍNICA	GENOTIPO										TOTAL
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
ETI	35	26	2	13	1	6	0	12	1	1	97
IRAG	60	53	0	12	2	0	6	18	4	0	155
IRAG INUSITADA	8	5	0	5	0	2	1	12	1	1	35

Anexo 3.

Tabla 26. Datos del ensablado del aislado peruano A/Ancash/INS4_421/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	113	113	113	113	113	113	113	113
# contigs (>= 1000 bp)	17	17	17	17	17	17	17	17
Total length (>= 0 bp)	60694	60694	60694	60694	60694	60694	60694	60694
Total length (>= 1000 bp)	34665	34665	34665	34665	34665	34665	34665	34665
# contigs	25	25	25	25	25	25	25	25
Largest contig	3899	3899	3899	3899	3899	3899	3899	3899
Total length	39570	39570	39570	39570	39570	39570	39570	39570
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	44.78	44.78	44.78	44.78	44.78	44.78	44.78	44.78
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	2024	2024	2024	2024	2024	2024	2024	2024
NG50	3899	3899	3899	3899	3899	3899	3899	3899
N75	1571	1571	1571	1571	1571	1571	1571	1571
NG75	3899	3899	3899	3899	3899	3899	3899	3899
L50	8	8	8	8	8	8	8	8
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	14	14	14	14	14	14	14	14
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	2	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. Contigs	6	0	5	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	18 + 7 part	22 + 0 part	18 + 7 part	23 + 0 part	24 + 0 part	18 + 7 part	19 + 4 part	24 + 0 part
Unaligned length	34085	35958	34870	37569	37956	29455	32523	37463
Genome fraction (%)	100	100	99.775	100	99.936	99.313	100	100
Duplication ratio	2.344	1.548	2.123	2.276	1.038	7	6.936	1.203
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	4871.79	3429.06	4426.38	4550.63	2057.88	17439.45	9448.82	3940.61
# indels per 100 kbp	0	42.86	0	0	64.31	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	5489	3447	4711	1758	1554	10115	6096	1751
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 27. Datos del ensablado del aislado peruano A/Arequipa/INS5_081/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	253	253	253	253	253	253	253	253
# contigs (>= 1000 bp)	10	10	10	10	10	10	10	10
Total length (>= 0 bp)	81035	81035	81035	81035	81035	81035	81035	81035
Total length (>= 1000 bp)	16666	16666	16666	16666	16666	16666	16666	16666
# contigs	19	19	19	19	19	19	19	19
Largest contig	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425
Total length	22226	22226	22226	22226	22226	22226	22226	22226
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	44.28	44.28	44.28	44.28	44.28	44.28	44.28	44.28
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1602	1602	1602	1602	1602	1602	1602	1602
NG50	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425
N75	976	976	976	976	976	976	976	976
NG75	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425
L50	6	6	6	6	6	6	6	6
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	11	11	11	11	11	11	11	11
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. Contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	18 + 0 part	17 + 0 part	17 + 0 part	17 + 0 part	18 + 0 part	18 + 0 part	18 + 0 part	18 + 0 part
Unaligned length	19801	19611	19611	19752	21250	20624	21120	20432
Genome fraction (%)	99.701	100	100	99.086	100	98.586	100	100
Duplication ratio	1.039	1.121	1.121	1.238	1.11	1.044	1.089	1.025
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2871.84	1885.98	1885.98	1700.85	2389.08	1760.1	1574.8	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 28. Datos del ensablado del aislado peruano A/Arequipa/INS5_881/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	215	215	215	215	215	215	215	215
# contigs (>= 1000 bp)	11	11	11	11	11	11	11	11
Total length (>= 0 bp)	60140	60140	60140	60140	60140	60140	60140	60140
Total length (>= 1000 bp)	15368	15368	15368	15368	15368	15368	15368	15368
# contigs	15	15	15	15	15	15	15	15
Largest contig	1831	1831	1831	1831	1831	1831	1831	1831
Total length	18268	18268	18268	18268	18268	18268	18268	18268
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	43.49	43.49	43.49	43.49	43.49	43.49	43.49	43.49
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1303	1303	1303	1303	1303	1303	1303	1303
NG50	1831	1831	1831	1831	1831	1831	1831	1831
N75	1118	1118	1118	1118	1118	1118	1118	1118
NG75	1831	1831	1831	1831	1831	1831	1831	1831
L50	6	6	6	6	6	6	6	6
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	10	10	10	10	10	10	10	10
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. Contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	14 + 0 part	14 + 0 part	14 + 0 part	14 + 0 part	14 + 0 part	14 + 0 part	14 + 0 part	14 + 0 part
Unaligned length	16455	16619	16965	17242	16655	17021	17150	16437
Genome fraction (%)	100	100	99.955	100	97.751	100	100	100
Duplication ratio	1	1	1	1.167	1.037	1.004	1.1	1.046
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2426.92	2243.78	2762.85	2047.78	2313.62	2737.52	1377.95	4111.94
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	64.27	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 29. Datos del ensablado del aislado peruano A/Arequipa/INS6_868/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	253	253	253	253	253	253	253	253
# contigs (>= 1000 bp)	10	10	10	10	10	10	10	10
Total length (>= 0 bp)	81035	81035	81035	81035	81035	81035	81035	81035
Total length (>= 1000 bp)	16666	16666	16666	16666	16666	16666	16666	16666
# contigs	19	19	19	19	19	19	19	19
Largest contig	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425
Total length	22226	22226	22226	22226	22226	22226	22226	22226
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.53	42.53	42.53	42.53	42.53	42.53	42.53	42.53
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1602	1602	1602	1602	1602	1602	1602	1602
NG50	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425
N75	976	976	976	976	976	976	976	976
NG75	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425	2425
L50	6	6	6	6	6	6	6	6
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	11	11	11	11	11	11	11	11
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	18 + 0 part	17 + 0 part	17 + 0 part	18 + 0 part	18 + 0 part	18 + 0 part	18 + 0 part	18 + 0 part
Unaligned length	19801	19611	19752	21250	20624	20667	21120	20432
Genome fraction (%)	99.701	100	90.086	100	98.586	99.656	100	100
Duplication ratio	1.039	1.121	1.238	1.11	1.044	1.075	1.089	1.025
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2871.84	1885.98	1700.85	2389.08	1760.1	2689.66	1574.8	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 30. Datos del ensablado del aislado peruano A/Cusco/INS5_825/2015

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	164	164	164	164	164	164	164	164
# contigs (>= 1000 bp)	13	13	13	13	13	13	13	13
Total length (>= 0 bp)	74978	74978	74978	74978	74978	74978	74978	74978
Total length (>= 1000 bp)	37285	37285	37285	37285	37285	37285	37285	37285
# contigs	17	17	17	17	17	17	17	17
Largest contig	6229	6229	6229	6229	6229	6229	6229	6229
Total length	40020	40020	40020	40020	40020	40020	40020	40020
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.72	42.72	42.72	42.72	42.72	42.72	42.72	42.72
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	2652	2652	2652	2652	2652	2652	2652	2652
NG50	6229	6229	6229	6229	6229	6229	6229	6229
N75	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371
NG75	6229	6229	6229	6229	6229	6229	6229	6229
L50	5	5	5	5	5	5	5	5
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	9	9	9	9	9	9	9	9
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	3
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	3
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	15366
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	3	0	3	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	12 + 5 part	16 + 0 part	14 + 3 part	10 + 6 part	16 + 0 part	16 + 0 part	12 + 5 part	14 + 2 part
Unaligned length	35908	37649	35473	34539	38426	38480	34940	28644
Genome fraction (%)	100	100	99.955	100	97.751	100	100	100
Duplication ratio	1.757	1.016	2.05	6.235	1.048	1.058	5	6.497
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3931.62	2100.3	4508.57	12400.46	2235.37	2680.41	6889.76	25356.94
# indels per 100 kbp	0	0	45.09	0	65.75	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	4115	2333	4547	5360	1520	1455	5080	10506
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 31. Datos del ensablado del aislado peruano A/La_Libertad/INS5_380/2015

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	202	202	202	202	202	202	202	202
# contigs (>= 1000 bp)	9	9	9	9	9	9	9	9
Total length (>= 0 bp)	60797	60797	60797	60797	60797	60797	60797	60797
Total length (>= 1000 bp)	14477	14477	14477	14477	14477	14477	14477	14477
# contigs	11	11	11	11	11	11	11	11
Largest contig	2072	2072	2072	2072	2072	2072	2072	2072
Total length	15954	15954	15954	15954	15954	15954	15954	15954
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.17	42.17	42.17	42.17	42.17	42.17	42.17	42.17
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1609	1609	1609	1609	1609	1609	1609	1609
NG50	2072	2072	2072	2072	2072	2072	2072	2072
N75	1509	1509	1509	1509	1509	1509	1509	1509
NG75	2072	2072	2072	2072	2072	2072	2072	2072
L50	5	5	5	5	5	5	5	5
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	7	7	7	7	7	7	7	7
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	1
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	10 + 0 part	9 + 1 part	9 + 1 part	10 + 0 part	10 + 0 part	10 + 0 part	10 + 0 part	10 + 0 part
Unaligned length	13882	13769	14009	15023	14345	14445	14158	14119
Genome fraction (%)	98.547	99.213	100	100	99.614	99.725	100	100
Duplication ratio	1	1.027	1.011	1.059	1.038	1.04	1.768	1.083
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2364.86	2255.64	2442.83	2047.78	2451.61	2618.88	1476.38	4542.77
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	2	1	1	1	1	1

Tabla 32. Datos del ensablado del aislado peruano A/Lambayeque/INS5_514/2015

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	377	377	377	377	377	377	377	377
# contigs (>= 1000 bp)	17	17	17	17	17	17	17	17
Total length (>= 0 bp)	136585	136585	136585	136585	136585	136585	136585	136585
Total length (>= 1000 bp)	27139	27139	27139	27139	27139	27139	27139	27139
# contigs	58	58	58	58	58	58	58	58
Largest contig	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371
Total length	54456	54456	54456	54456	54456	54456	54456	54456
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.17	45.22	45.22	45.22	45.22	45.22	45.22	45.22
Reference GC (%)	44.82	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	974	974	974	974	974	974	974	974
NG50	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371
N75	659	659	659	659	659	659	659	659
NG75	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371	2371
L50	18	18	18	18	18	18	18	18
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	35	35	35	35	35	35	35	35
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	1	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	57 + 0 part	57 + 0 part	57 + 0 part	57 + 0 part	57 + 0 part	57 + 0 part	57 + 0 part	57 + 0 part
Unaligned length	52085	52085	52169	53200	52818	52913	53348	52649
Genome fraction (%)	100	100	99.955	100	99.614	99.656	100	100
Duplication ratio	1.016	1.016	1.031	1.429	1.057	1.064	1.091	1.032
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	1971.71	1971.71	1893.6	2161.55	2000	2689.66	1673.23	4283.27
# indels per 100 kbp	0	42.86	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 33. Datos del ensablado del aislado peruano A/Lambayeque/INS5_790/2015

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016
# contigs (>= 1000 bp)	13	13	13	13	13	13	13	13
Total length (>= 0 bp)	273074	273074	273074	273074	273074	273074	273074	273074
Total length (>= 1000 bp)	21250	21250	21250	21250	21250	21250	21250	21250
# contigs	51	51	51	51	51	51	51	51
Largest contig	2363	2363	2363	2363	2363	2363	2363	2363
Total length	45523	45523	45523	45523	45523	45523	45523	45523
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	862	862	862	862	862	862	862	862
NG50	2363	2363	2363	2363	2363	2363	2363	2363
N75	629	629	629	629	629	629	629	629
NG75	2363	2363	2363	2363	2363	2363	2363	2363
L50	15	15	15	15	15	15	15	15
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	31	31	31	31	31	31	31	31
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	50 + 0 part	50 + 0 part	50 + 0 part	50 + 0 part	50 + 0 part	50 + 0 part	50 + 0 part	50 + 0 part
Unaligned length	43625	43160	43212	44894	43877	44034	44095	43348
Genome fraction (%)	99.111	99.786	99.955	68.373	99.614	99.656	100	100
Duplication ratio	1	1.015	1.042	1.047	1.062	1.027	1.406	1.242
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3108.54	1890.03	1848.51	1830.28	2064.52	2689.66	1574.8	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	758	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	1193	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	678	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	325	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	2	1	1	1	1

Tabla 34. Datos del ensablado del aislado peruano A/Lima/INS3_701/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	156	156	156	156	156	156	156	156
# contigs (>= 1000 bp)	8	8	8	8	8	8	8	8
Total length (>= 0 bp)	54389	54389	54389	54389	54389	54389	54389	54389
Total length (>= 1000 bp)	14660	14660	14660	14660	14660	14660	14660	14660
# contigs	16	16	16	16	16	16	16	16
Largest contig	2427	2427	2427	2427	2427	2427	2427	2427
Total length	19953	19953	19953	19953	19953	19953	19953	19953
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.87	42.87	42.87	42.87	42.87	42.87	42.87	42.87
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1650	1650	1650	1650	1650	1650	1650	1650
NG50	2427	2427	2427	2427	2427	2427	2427	2427
N75	988	988	988	988	988	988	988	988
NG75	2427	2427	2427	2427	2427	2427	2427	2427
L50	5	5	5	5	5	5	5	5
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	9	9	9	9	9	9	9	9
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	15 + 0 part	15 + 0 part	15 + 0 part	15 + 0 part	15 + 0 part	15 + 0 part	15 + 0 part	15 + 0 part
Unaligned length	17526	17552	17892	18965	18335	18439	18846	18071
Genome fraction (%)	100	100	92.88	100	99.614	98.969	100	100
Duplication ratio	1.037	1.029	1	1.124	1.044	1.051	1.09	1.075
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2820.51	1843.12	1892.29	2161.55	1935.48	2708.33	1574.8	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 35. Datos del ensablado del aislado peruano A/Lima/INS4_403/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	109	109	109	109	109	109	109	109
# contigs (>= 1000 bp)	8	8	8	8	8	8	8	8
Total length (>= 0 bp)	45360	45360	45360	45360	45360	45360	45360	45360
Total length (>= 1000 bp)	17267	17267	17267	17267	17267	17267	17267	17267
# contigs	14	14	14	14	14	14	14	14
Largest contig	3511	3511	3511	3511	3511	3511	3511	3511
Total length	21433	21433	21433	21433	21433	21433	21433	21433
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.36	42.36	42.36	42.36	42.36	42.36	42.36	42.36
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	2304	2304	2304	2304	2304	2304	2304	2304
NG50	3511	3511	3511	3511	3511	3511	3511	3511
N75	1549	1549	1549	1549	1549	1549	1549	1549
NG75	3511	3511	3511	3511	3511	3511	3511	3511
L50	4	4	4	4	4	4	4	4
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	7	7	7	7	7	7	7	7
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	12 + 0 part	12 + 2 part	12 + 0 part	13 + 1 part	13 + 1 part	13 + 1 part	13 + 1 part	13 + 0 part
Unaligned length	18219	18114	18351	20557	19857	19983	20417	19590
Genome fraction (%)	99.744	100	99.955	99.659	100	99.656	100	100
Duplication ratio	1.377	1.423	1.39	1	1	1	1	1.053
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3770.35	2657.52	2344.45	2168.95	2368.95	2689.66	1673.23	4283.27
# indels per 100 kbp	42.84	0	45.09	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	3081	3319	2910	863	1497	1450	1016	1751
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 36. Datos del ensablado del aislado peruano A/Lima/LIMAM16_372/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	318	318	318	318	318	318	318	318
# contigs (>= 1000 bp)	8	8	8	8	8	8	8	8
Total length (>= 0 bp)	97153	97153	97153	97153	97153	97153	97153	97153
Total length (>= 1000 bp)	14082	14082	14082	14082	14082	14082	14082	14082
# contigs	23	23	23	23	23	23	23	23
Largest contig	2417	2417	2417	2417	2417	2417	2417	2417
Total length	23784	23784	23784	23784	23784	23784	23784	23784
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39	43.39
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1302	1302	1302	1302	1302	1302	1302	1302
NG50	2417	2417	2417	2417	2417	2417	2417	2417
N75	730	730	730	730	730	730	730	730
NG75	2417	2417	2417	2417	2417	2417	2417	2417
L50	7	7	7	7	7	7	7	7
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	13	13	13	13	13	13	13	13
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	22 + 0 part	21 + 1 part	21 + 1 part	22 + 1 part	22 + 1 part	22 + 0 part	22 + 0 part	22 + 0 part
Unaligned length	21367	21475	21761	22905	23005	21997	22482	21973
Genome fraction (%)	100	96.614	99.167	100	70.064	99.45	99.409	99.486
Duplication ratio	1.033	1.024	1	1	1	1.235	1.289	1.04
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2264.96	2351.38	2273.85	2389.08	2182.28	2695.23	1386.14	4018.37
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1246	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1845	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1125	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	875	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	2	1	1	1

Tabla 37. Datos del ensablado del aislado peruano A/Loreto/INS5_168/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	997	997	997	997	997	997	997	997
# contigs (>= 1000 bp)	32	32	32	32	32	32	32	32
Total length (>= 0 bp)	323558	323558	323558	323558	323558	323558	323558	323558
Total length (>= 1000 bp)	41594	41594	41594	41594	41594	41594	41594	41594
# contigs	120	120	120	120	120	120	120	120
Largest contig	1892	1892	1892	1892	1892	1892	1892	1892
Total length	104103	104103	104103	104103	104103	104103	104103	104103
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	45.7	45.7	45.7	45.7	45.7	45.7	45.7	45.7
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	880	880	880	880	880	880	880	880
NG50	1892	1892	1892	1892	1892	1892	1892	1892
N75	702	702	702	702	702	702	702	702
NG75	1892	1892	1892	1892	1892	1892	1892	1892
L50	44	44	44	44	44	44	44	44
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	76	76	76	76	76	76	76	76
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	119 + 0 part	119 + 0 part	118 + 1 part	118 + 1 part	118 + 1 part	119 + 0 part	119 + 0 part	119 + 0 part
Unaligned length	102552	102451	102497	102497	102497	102617	103059	102298
Genome fraction (%)	100	100	100	100	100	99.656	97.343	100
Duplication ratio	1	1	1.004	1.004	1.004	1.025	1.056	1.031
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3223.73	2058.11	1937.5	1937.5	1937.5	2689.66	1718.91	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	101.11	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 38. Datos del ensablado del aislado peruano A/Pasco/INS6_335/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	1104	1104	1104	1104	1104	1104	1104	1104
# contigs (>= 1000 bp)	35	35	35	35	35	35	35	35
Total length (>= 0 bp)	340793	340793	340793	340793	340793	340793	340793	340793
Total length (>= 1000 bp)	48786	48786	48786	48786	48786	48786	48786	48786
# contigs	107	107	107	107	107	107	107	107
Largest contig	2487	2487	2487	2487	2487	2487	2487	2487
Total length	98161	98161	98161	98161	98161	98161	98161	98161
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	46.42	46.42	46.42	46.42	46.42	46.42	46.42	46.42
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	989	989	989	989	989	989	989	989
NG50	2487	2487	2487	2487	2487	2487	2487	2487
N75	686	686	686	686	686	686	686	686
NG75	2487	2487	2487	2487	2487	2487	2487	2487
L50	36	36	36	36	36	36	36	36
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	66	66	66	66	66	66	66	66
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	105 + 0 part	106 + 0 part	106 + 0 part	106 + 0 part	106 + 0 part	106 + 0 part	106 + 1 part	106 + 0 part
Unaligned length	96576	97487	96226	96226	96226	96722	97263	96371
Genome fraction (%)	68.547	70.544	100	100	100	95.395	100	100
Duplication ratio	1.156	1.158	1	1	1	1.037	1	1.022
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	1671.06	2144.14	1976.5	1976.5	1976.5	2593.66	1781.74	4340.38
# indels per 100 kbp	0	0	267.09	267.09	267.09	0	0	0
Largest alignment	1193	1195	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2490	2490	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	1193	1180	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	895	932	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	2	2	1	1	1	1	1	1

Tabla 39. Datos del ensablado del aislado peruano A/Piura/INS4_288/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	397	397	397	397	397	397	397	397
# contigs (>= 1000 bp)	10	10	10	10	10	10	10	10
Total length (>= 0 bp)	116415	116415	116415	116415	116415	116415	116415	116415
Total length (>= 1000 bp)	18729	18729	18729	18729	18729	18729	18729	18729
# contigs	24	24	24	24	24	24	24	24
Largest contig	3417	3417	3417	3417	3417	3417	3417	3417
Total length	27559	27559	27559	27559	27559	27559	27559	27559
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	44	44	44	44	44	44	44	44
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1605	1605	1605	1605	1605	1605	1605	1605
NG50	3417	3417	3417	3417	3417	3417	3417	3417
N75	754	754	754	754	754	754	754	754
NG75	3417	3417	3417	3417	3417	3417	3417	3417
L50	7	7	7	7	7	7	7	7
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	13	13	13	13	13	13	13	13
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	23 + 1 part	23 + 0 part	23 + 0 part	23 + 0 part	23 + 0 part	23 + 0 part	23 + 1 part	23 + 0 part
Unaligned length	25232	25190	25297	26597	26597	25954	26543	25722
Genome fraction (%)	99.444	100	99.91	100	100	99.656	100	100
Duplication ratio	1	1.015	1.02	1.094	1.094	1.107	1	1.049
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3094.11	1928.85	1894.45	2161.55	2161.55	2689.66	1673.23	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 40. Datos del ensablado del aislado peruano A/Piura/INS4_294/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	1321	1321	1321	1321	1321	1321	1321	1321
# contigs (>= 1000 bp)	24	24	24	24	24	24	24	24
Total length (>= 0 bp)	364701	364701	364701	364701	364701	364701	364701	364701
Total length (>= 1000 bp)	32716	32716	32716	32716	32716	32716	32716	32716
# contigs	86	86	86	86	86	86	86	86
Largest contig	1804	1804	1804	1804	1804	1804	1804	1804
Total length	75278	75278	75278	75278	75278	75278	75278	75278
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	44.4	44.4	44.4	44.4	44.4	44.4	44.4	44.4
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	897	897	897	897	897	897	897	897
NG50	1804	1804	1804	1804	1804	1804	1804	1804
N75	655	655	655	655	655	655	655	655
NG75	1804	1804	1804	1804	1804	1804	1804	1804
L50	30	30	30	30	30	30	30	30
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	54	54	54	54	54	54	54	54
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	85 + 0 part	85 + 0 part	85 + 0 part	85 + 0 part	85 + 0 part	85 + 0 part	85 + 0 part	85 + 0 part
Unaligned length	73728	73680	73920	74284		73781	74200	73474
Genome fraction (%)	100	99.954	99.875	100	100	99.656	100	100
Duplication ratio	1.004	1	1.004	1.131	1.025	1.032	1.061	1.03
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3108.81	2002.5	1847.75	2161.55	2482.51	2689.66	1673.23	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 41. Datos del ensablado del aislado peruano A/Piura/INS4_888/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	191	191	191	191	191	191	191	191
# contigs (>= 1000 bp)	12	12	12	12	12	12	12	12
Total length (>= 0 bp)	78364	78364	78364	78364	78364	78364	78364	78364
Total length (>= 1000 bp)	28057	28057	28057	28057	28057	28057	28057	28057
# contigs	25	25	25	25	25	25	25	25
Largest contig	4409	4409	4409	4409	4409	4409	4409	4409
Total length	36422	36422	36422	36422	36422	36422	36422	36422
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.82	42.82	42.82	42.82	42.82	42.82	42.82	42.82
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1952	1952	1952	1952	1952	1952	1952	1952
NG50	4409	4409	4409	4409	4409	4409	4409	4409
N75	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305
NG75	4409	4409	4409	4409	4409	4409	4409	4409
L50	6	6	6	6	6	6	6	6
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	12	12	12	12	12	12	12	12
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	1	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	1	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	2550	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	1	1	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	21 + 4 part	21 + 4 part	22 + 0 part	20 + 4 part	20 + 4 part	24 + 1 part	24 + 1 part	24 + 1 part
Unaligned length	32872	31822	32590	31464	31487	34972	35406	34671
Genome fraction (%)	100	100	99.955	98.976	98.989	99.656	100	100
Duplication ratio	1.992	1.972	1.728	5.699	2.846	1	1	1
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3571.92	3471.92	3065.83	10919.54	8987.78	2689.66	1673.23	4283.27
# indels per 100 kbp	78.94	85.73	225.43	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	5412	4601	3500	4350	2548	1450	1016	1751
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 42. Datos del ensablado del aislado peruano A/Puno/INS6_006/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	599	599	599	599	599	599	599	599
# contigs (>= 1000 bp)	24	24	24	24	24	24	24	24
Total length (>= 0 bp)	219964	219964	219964	219964	219964	219964	219964	219964
Total length (>= 1000 bp)	35699	35699	35699	35699	35699	35699	35699	35699
# contigs	100	100	100	100	100	100	100	100
Largest contig	2370	2370	2370	2370	2370	2370	2370	2370
Total length	89686	89686	89686	89686	89686	89686	89686	89686
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	44.56	44.56	44.56	44.56	44.56	44.56	44.56	44.56
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	905	905	905	905	905	905	905	905
NG50	2370	2370	2370	2370	2370	2370	2370	2370
N75	709	709	709	709	709	709	709	709
NG75	2370	2370	2370	2370	2370	2370	2370	2370
L50	34	34	34	34	34	34	34	34
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	63	63	63	63	63	63	63	63
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	99 + 0 part	99 + 0 part	99 + 0 part	99 + 0 part	99 + 0 part	99 + 0 part	99 + 0 part	99 + 0 part
Unaligned length	87316	87352	87431	89001	98167	88178	88616	87887
Genome fraction (%)	100	70.357	99.955	100	98.157	98.419	99.606	100
Duplication ratio	1.013	1.084	1.017	1.04	1.007	1.053	1.057	1.027
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3034.19	1898.19	1803.43	1830.28	2879.68	2723.46	1679.84	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	1245	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2222	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	1340	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	870	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	2	1	1	1	1	1	1

Tabla 43. Datos del ensablado del aislado peruano A/Arequipa/INS6_950/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	606	606	606	606	606	606	606	606
# contigs (>= 1000 bp)	20	20	20	20	20	20	20	20
Total length (>= 0 bp)	195019	195019	195019	195019	195019	195019	195019	195019
Total length (>= 1000 bp)	29681	29681	29681	29681	29681	29681	29681	29681
# contigs	70	70	70	70	70	70	70	70
Largest contig	2270	2270	2270	2270	2270	2270	2270	2270
Total length	63243	63243	63243	63243	63243	63243	63243	63243
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	45.42	45.42	45.42	45.42	45.42	45.42	45.42	45.42
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	981	981	981	981	981	981	981	981
NG50	2270	2270	2270	2270	2270	2270	2270	2270
N75	685	685	685	685	685	685	685	685
NG75	2270	2270	2270	2270	2270	2270	2270	2270
L50	22	22	22	22	22	22	22	22
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	42	42	42	42	42	42	42	42
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	69 + 0 part	69 + 0 part	69 + 0 part	69 + 0 part	69 + 0 part	69 + 0 part	69 + 0 part	69 + 0 part
Unaligned length	61378	60973	61282	62254	623489	61733	61765	61394
Genome fraction (%)	99.701	99.242	98.373	100	100	99.656	100	100
Duplication ratio	1	1.022	1	1.125	1.125	1.041	1.455	1.056
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	3163.54	1935.19	1682.81	2161.55	2161.55	2689.66	1673.23	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 44. Datos del ensablado del aislado peruano A/Arequipa/INS8_499/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	247	247	247	247	247	247	247	247
# contigs (>= 1000 bp)	5	5	5	5	5	5	5	5
Total length (>= 0 bp)	70033	70033	70033	70033	70033	70033	70033	70033
Total length (>= 1000 bp)	12977	12977	12977	12977	12977	12977	12977	12977
# contigs	6	6	6	6	6	6	6	6
Largest contig	4612	4612	4612	4612	4612	4612	4612	4612
Total length	13952	13952	13952	13952	13952	13952	13952	13952
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.86	42.86	42.86	42.86	42.86	42.86	42.86	42.86
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	2592	2592	2592	2592	2592	2592	2592	2592
NG50	4612	4612	4612	4612	4612	4612	4612	4612
N75	1839	1839	1839	1839	1839	1839	1839	1839
NG75	4612	4612	4612	4612	4612	4612	4612	4612
L50	2	2	2	2	2	2	2	2
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	4	4	4	4	4	4	4	4
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	5 + 0 part	5 + 1 part	5 + 1 part	5 + 0 part	5 + 0 part	5 + 1 part	5 + 1 part	5 + 0 part
Unaligned length	11567	11619	11734	12977	12977	12497	12936	12113
Genome fraction (%)	100	100	99.955	100	100	100	100	100
Duplication ratio	1.019	1	1	1.109	1.109	1	1	1.05
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2435.9	2228.89	2299.37	2047.78	2047.78	2680.41	1377.95	4169.05
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
Total aligned length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA50	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
NGA75	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 45. Datos del ensablado del aislado peruano A /Tumbes/INS4_860/2016

Assembly	PB1	PB2	PA	NS	NP	NA	M	HA
# contigs (>= 0 bp)	439	439	439	439	439	439	439	439
# contigs (>= 1000 bp)	6	6	6	6	6	6	6	6
Total length (>= 0 bp)	114801	114801	114801	114801	114801	114801	114801	114801
Total length (>= 1000 bp)	10930	10930	10930	10930	10930	10930	10930	10930
# contigs	10	10	10	10	10	10	10	10
Largest contig	2601	2601	2601	2601	2601	2601	2601	2601
Total length	14167	14167	14167	14167	14167	14167	14167	14167
Reference length	2274	2280	2151	863	1497	1410	982	1701
GC (%)	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48
Reference GC (%)	42	44.82	44.23	43.57	46.26	42.13	47.15	40.79
N50	1834	1834	1834	1834	1834	1834	1834	1834
NG50	2601	2601	2601	2601	2601	2601	2601	2601
N75	1140	1140	1140	1140	1140	1140	1140	1140
NG75	2601	2601	2601	2601	2601	2601	2601	2601
L50	4	4	4	4	4	4	4	4
LG50	1	1	1	1	1	1	1	1
L75	6	6	6	6	6	6	6	6
LG75	1	1	1	1	1	1	1	1
# misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# misassembled contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
Misassembled contigs length	0	0	0	0	0	0	0	0
# local misassemblies	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned mis. contigs	0	0	0	0	0	0	0	0
# unaligned contigs	8 + 1 part	8 + 0 part	9 + 0 part	9 + 0 part	9 + 0 part	9 + 1 part	9 + 1 part	9 + 0 part
Unaligned length	11893	12042	12142	13176	13295	12717	13151	12333
Genome fraction (%)	94.829	78.44	90.987	99.772	56.041	99.656	100	100
Duplication ratio	1.025	1.161	1.003	1.13	1	1	1	1.047
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
# mismatches per 100 kbp	2884.18	1639.34	1832.59	2166.48	1949.54	2689.66	1574.8	4283.27
# indels per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0
Largest alignment	2274	1281	2151	863	1872	1410	982	1701
Total aligned length	2274	1882	2151	863	1272	1410	982	1701
NGA50	2274	1281	2151	863	872	1410	982	1701
NGA75	2274	601	2151	863	604	1410	982	1701
LGA50	1	1	1	1	1	1	1	1
LGA75	1	2	1	1	2	1	1	1

Anexo 4.

Secuencia aminoacidica de la proteína Hemaglutinina del virus influenza A (H1N1) pdm09 de cepas peruanas aisladas durante 2015 y 2016

>A/Puno/INS6_006/2016

MKAILVVLLYTLTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETS
NSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Loreto/INS5_168/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Lima/LIMAM16_372/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTIERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Tumbes/INS4_860/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Piura/INS4_294/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Piura/INS4_888/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT

CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Piura/INS4_288/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Pasco/INS6_335/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Lima/INS3_701/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Lima/INS4_403/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Lambayeque/INS5_790/2015

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SSSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPPTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Lambayeque/INS5_514/2015

MKAILVVLLYTFTTAKADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETS
SSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIHH
PSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC
QTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITNK
VNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCM
ESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/La_Libertad/INS5_380/2015

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Cusco/INS5_825/2015

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SSSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPPTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTIERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Arequipa/INS8_499/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICN*

>A/Arequipa/INS6_950/2016

MKAILVVLLYTLTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETS
NSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Arequipa/INS6_868/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

>A/Arequipa/INS5_881/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRNNN*

>A/Arequipa/INS5_081/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTIERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN

KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRINN*

>A/Ancash/INS4_421/2016

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVET
SNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIH
HPSTTADQQSLYQNADAYVFVGTSRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT
CQTPEGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITN
KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYEYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

Anexo 5.

Secuencia aminoacidica de la proteína Neuraminidasa del virus influenza A (H1N1) pdm09 de cepas peruanas aisladas durante 2015 y 2016

>A/Ancash/INS4_421/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Arequipa/INS5_081/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Arequipa/INS5_881/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Arequipa/INS6_868/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Arequipa/INS6_950/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Arequipa/INS8_499/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Cusco/INS5_825/2015

MNPNQKIITGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYS
KDNSVRIGSKGDVFVMREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPN
SGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHG
SNRPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSTSSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQD

IVGINEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/La_Libertad/INS5_380/2015

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVMREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPNS
GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGS
NRPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSTSSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDI
VGINEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Lambayeque/INS5_514/2015

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVMREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPNS
GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGS
NRPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSTSSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDI
VGINEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Lambayeque/INS5_790/2015

MNPNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYS
KDNSVRIGSKGDVFVMREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPN
SGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHG
SNRPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSTSSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQD
IVGINEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Lima/INS3_701/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Lima/INS4_403/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Lima/LIMAM16_372/2016

MNPNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYS
KDNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDS
GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGS
NRPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIV
GINEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Loreto/INS5_168/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Pasco/INS6_335/2016

MNPNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYS

KDNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDS
GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGS
NRPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIV
GINEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Piura/INS4_288/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Piura/INS4_294/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Piura/INS4_888/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Puno/INS6_006/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

>A/Tumbes/INS4_860/2016

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSK
DNSVRIGSKGDVFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSG
AVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKGKIIKSVEMKAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN
RPWVSFNQNLEYQMGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKFSIKQDIVG
INEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK*

XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

Publicación de un artículo científico en Bioinformation generada durante la ejecución de la Maestría en Biología Molecular.

Lope P, Maribel H, Egma M, Henri B, Carlos P. (2019). Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 isolates of Peru using HRM, a post PCR molecular biology method. Bioinformation. 15(9):640-645. doi: 10.6026/97320630015640. PMID: 31787813; PMCID: PMC6859703.

BIOINFORMATION
Discovery at the interface of physical and biological sciences

OPEN ACCESS GOLD

BIOMEDICAL INFORMATICS

www.bioinformation.net
Volume 15(9)

Research Article

Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 isolates of Peru using HRM, a post PCR molecular biology method

Priscila Lope[1,3,*], Huaringa Maribel[1], Mayta Egma[3], Bailon Henri[2], Padilla Carlos[2]

[1]Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorio, Centro Nacional de Salud Publica, Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru; [2]Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnologia y Biologia Molecular. Centro Nacional de Salud Publica. Instituto Nacional de Salud. Lima. Peru; [3]Laboratorio de virologia. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Peru; Priscila Lope - E-mail: priscila.lope@unmsm.edu.pe; *Corresponding author

Received September 28, 2019; Revised October 6, 2019; Accepted October 7, 2019; Published October 10, 2019

DOI: 10.6026/97320630015640

Abstract:

Influenza caused by A(H1N1)pdm09 is a public health issue with severe conditions in vulnerable populations leading to death. Therefore, it is of interest to characterize and monitor influenza A(H1N1)pdm09 genotypes using High Resolution Melting (HRM), a post PCR molecular biology method. We used HRM analysis (using RotorGene Q thermocycler) to characterize A(H1N1)pdm09 genotypes from several places of Peru. RNA was purified from nasal and pharyngeal swab samples referred to LRNVR-INS, synthesized cDNA, and then the hemagglutinin gene and matrix fragment were amplified. Thus, 287 samples positive for influenza A(H1N1)pdm09 were identified across Peru where places like Lima, Piura, and Arequipa documented highest number of cases. The HRM data was analyzed and results showed different profiles which were further grouped into four genotypes for the HA (A, B, C, D) and 3 for the M (a, b, c) genes. We also report ten genotypes (I-X) of virus using combined HA (hemagglutinin) and M gene profiles representing a national geography. The prevalent genotypes are I and II with a frequency of 35.89% (103) and 29.27% (84), respectively linking with severe acute respiratory infection.

Keywords: High Resolution Melting, H1N1 Influenza Virus Subtype A, Genotype

Background:

Influenza viruses cause a highly contagious acute respiratory disease. Influenza A virus belonging to the family Orthomyxoviridae, this respiratory pathogen causes annual epidemics and occasional pandemics **[1].** Influenza A viruses tend to mutate rapidly and exchange RNA segments between same or different subtypes, generating new virus variants, this rearrangement or exchange of segments between different viruses that co-infect a cell is the main contributor to the increase in diversity and responsible for the most important pandemics **[2].** Influenza viruses have a high error rate (1×10^{-3} to 1×10^{-5}) during replication due to the low fidelity of RpdR, resulting in mutations in their nucleotide sequence **[3, 4].** Influenza has de ability to acquire genetic changes that overcome the immunity of previous infections and cause epidemics. The hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of influenza A viruses usually show high-frequency of variations **[5],** generating alterations in the antigenic characteristics of surface glycoproteins and susceptibility to antiviral drugs. In Peru, prevalence changes of A(H1N1)pdm09

©Biomedical Informatics (2019)

BIOINFORMATION
Discovery at the interface of physical and biological sciences

OPEN ACCESS GOLD

subtype were observed in the last years. During 2016, 52.2% (795 cases) of influenza confirmed cases were caused by influenza A(H1N1)pdm09subtype. In 2017, few cases of influenza A(H1N1)pdm09 (6 cases, 1.8%) were reported **[6].** In contrast in 2018, greater circulation of influenza A(H1N1)pdm09 was reported with a prevalence of 82.7% (956 cases); and for until 2019 June, only 7.8% (24 cases)has reported by LRNVR of Peruvian NIH. Characterization of the influenza virus is an important issue to monitor changes in epidemiological patterns and make decisions in public health. The appearance of new mutations in influenza A(H1N1)pdm09 isolates were reported, that mutations generate antigenic changes in hemagglutinin and drug-resistance alteration in neuraminidase **[7-13].** High-resolution melting (HRM) analysis showed capable identify mutations, capable of discriminating gene variations, recognizing viral genotypes **[14-18]** which is highly consistent with others methods as qPCR and genome sequencing **[7-13, 19-22].** In the present study, we characterized influenza A(H1N1)pdm09 virus in Peru using HRM analysis.

Methodology:

The nasal and pharyngeal swab samples were referred from several places of Peru to the National Reference Laboratory of Respiratory Virus of Peruvian National Institute of Health during 2015 and 2016, these were diagnosed by real-time RT-PCR as positive for influenza A(H1N1)pdm09 subtype **[23].** All samples with Ct less than 25 were chosen to ensure adequate viral load.

Viral RNA Extraction

For the extraction of viral RNA, the QIAcube automated nucleic acid purifier (QIAGEN) was used with the commercial kit QIAamp® Viral RNA Mini Handbook (QIAGEN) following the manufacturer's instructions.

High Resolution Melting analysis for determination of influenza A(H1N1)pdm09 virus genotypes

The primers HA-F (5´-CCC AAA GTR AGR GAT CAR GA-3´) and HA-R (5´-CCC TTG GGT GTY TGA CAY KT-3´) for the hemagglutinin gene were designed using the BatchPrimer3 program v1.0. For the matrix gene, the primers IFU-F (5 '-GCG AGG ACT GCA GCG TAG AC-3') and IFU-R (5'- 'TGA GAC CCA TGC AAC TGG CAA G-3') previously reported **[18]** were used. cDNA was synthesized by reverse transcription using 0.5 µL of 10 µM reverse primers (HA-R and IFU-R), 1 µL of 10 mM dNTP, 5 µL of nuclease-free water and 5 µL of purified RNA; it was denatured for 5 minutes at 65 °C. 8 µL of the RT reverse transcription reaction (4 µL of 5X RT buffer, 2 µL of 0.1 M DTT, 1.75 µL of nuclease-free water and 0.25 µL of RT SuperScript II RT enzyme) was added and incubated at 42 °C for 50 minutes, then reaction was stopped at 70 °C for 15 minutes; incubations were performed using a conventional thermocycler (Applied Biosystems).

Each gene was amplified using 5 µL of 2X HRM buffer (QIAGEN), 1.4 µL of primers mix (HA-F and HA-R for HA, or IFU-F and IFU-R for M) at 5 µM, 2 µL of cDNA and 1.6 µL of PCR water. The reaction tubes were placed in a RotorGen Q real-time thermocycler (Qiagen) and following thermal conditions was carried out: initial denaturation of 95 °C for 5 minutes, 45 cycles of 95 °C for 10 seconds, 55 °C for 30 seconds and 72 °C for 30 seconds, followed by high resolution melting step from 65 °C to 95 °C at a speed of 0.1 °C/second with acquisition on the green channel. The HRM analysis v 2.3.1 software from RotorGen was used to analyze the HRM profiles. Also, in each experiment A (H1N1)pdm09 influenza culture isolates were used as positive controls, these controls were used routinely for molecular diagnosis by LRNVR-INS. Additional, one Not Template Control was used as contamination control.

Statistical analysis

Descriptive statistics were applied through the construction of contingency tables and the chi-square test of Pearson of the statistical package Info Stat - Statistical Software Version 5.13.1 was used.

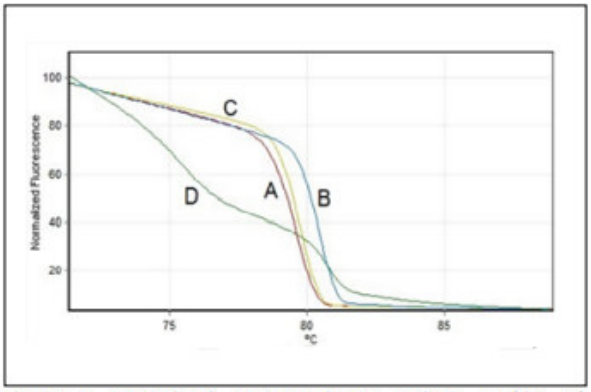


Figure 1: Normalized High-Resolution Melting profiles of Hemagglutinin gene. A, B, C, and D represent the profiles detected in influenza A(H1N1)pdm09 isolates of Peru during the year 2015 2016.

BIOINFORMATION
Discovery at the interface of physical and biological sciences

OPEN ACCESS GOLD

Results & Discussion:

788 samples (133 samples of 2015 and 655 of 2016) was reported positive for influenza A(H1N1)pdm09 by the LRNVR-INS using real-time RT-PCR method. From these samples, 287 (31 samples of 2015 and 256 of 2016) were selected because they had an appropriate viral load (Ct <25) for HRM analysis. Samples was classified according to age group: 23% (66) under 5, 13.2% (38) between 5 – 11, 1.7% (5) between 12 - 18, 50.5% (145) between 18 – 59, and 11.5% (33) over 60 years old; according to sex: 48.1% (138) female and 51.9% (149) male; according to clinical classification: 33.8% (97) cases of influenza-like illness (ETI), 54% (155) cases of severe acute respiratory infection (IRAG) and 12.2% (35) cases of severe acute respiratory in health workers (uIRAG). The isolates were grouped into 4 different genotypes using HA gene (A, B, C, and D) (**Figure 1**) and 3 genotypes using M gene (a, b and c) (**Figure 2**). This result is consistent with HA mutation rate (0.7-2.6%) which is higher than M mutation rate (0-0.6%) **[18].**

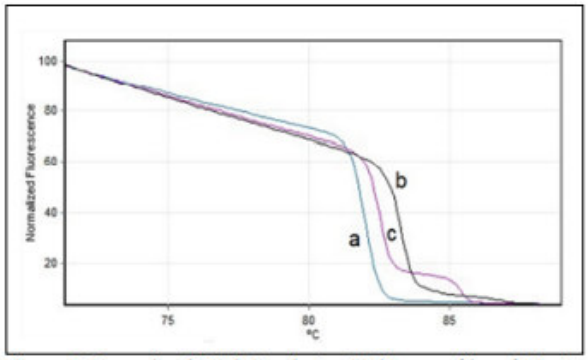


Figure 2: Normalized High-Resolution Melting profiles of Matriz gene. a, b, and c represent the profiles detected in influenza A(H1N1)pdm09 isolates of Peru during the year 2015-2016.

The HA and M profiles were combined to obtain ten genotypes (I-X) for the analyzed samples. The total samples are grouped with the following frequencies: 35.89% (103), 29.27% (84), 0.7% (2), 10.45% (30), 1.05% (3), 2.79% (8), 2.44% (7), 14.63% (42), 2.09% (6) and 0.70% (2) for genotypes I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX and X, respectively. Ten, seven and eight genotypes were detected in Arequipa, Lima and Piura, respectively (**Figure 3**). Our results reflect the prevalence of cases of influenza A(H1N1)pdm09 in 2015 and 2016 **[6]** since our sampling was proportional. Therefore, places where the greatest number of A(H1N1)pdm09 genotypes were detected (Piura, Lima, and Arequipa)corresponds to the places with the highest prevalence (**Figure 3**). In 2016, there was an increase in cases, mainly due to the occurrence of an outbreak in Arequipa **[24].**

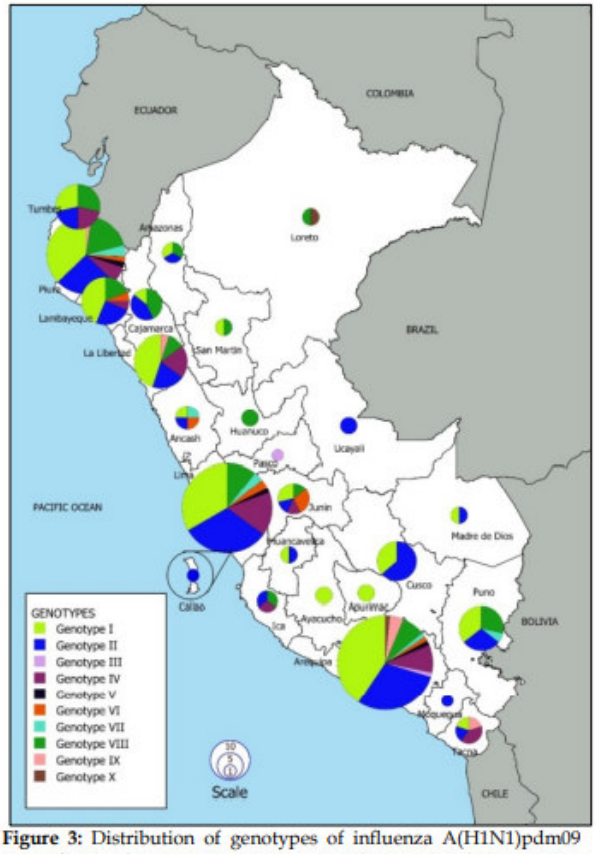


Figure 3: Distribution of genotypes of influenza A(H1N1)pdm09 virus during the years 2015-2016, using the HRM technique using the Matrix and Hemagglutinin genes. Size of circles represents the number of samples according to the scale. The map of Peru is divided by lines that represent the political division of the country. Map derived from QGIS 3.8.2-Zanzibar

BIOINFORMATION
Discovery at the interface of physical and biological sciences

The association between the age groups and the clinical status was evaluated obtaining: cases of children under five years (p = 0.0002), cases between 18 -60 years (p = 0.0001) and cases older than 60 years (p = 0.0013) were associated with IRAG while cases between 5 -11 years are associated with ETI (p = 0.0117). The results obtained indicate that there is no association between age groups and genotypes (p = 0.6807); in the same way, there is no association with sex and genotypes (p = 0.5240); however, we found a significant association between clinical status and genotypes (p = 0.0015). When performing an association analysis with partitions, a significant association was observed between 18-60 age group with genotypes I (p = 0.0001), II (p = 0.0001), IV (p = 0.0026), and VIII (p = 0.0001). The association analysis with partitions between genotypes and clinical classification showed an association between the IRAG status and genotype I (p = 0.0011), genotype II (p = 0.0005), and genotype VIII (p = 0.0055). The HRM analysis has proven to be a flexible, fast, efficient and cost-effective technique to characterize pathogens **[14-17].** Also, HRM analysis for characterization of influenza subtypes **[18, 25-27]** and resistance isolates were reported **[10-12, 28-31].** In this study, HRM analysis allowed us to analyze a larger number of samples compared to similar previous studies **[32-33],** which allowed us to obtain more robust data on the distribution of the most frequent genotypes circulating in Peru. Likewise, our results can be used to monitor changes in the distribution of influenza A(H1N1)pdm09 genotypes over time, like that reported in other studies **[7-8, 19-22].**

Conclusion:

The High Resolution Melting technique can be used to characterize Influenza A (H1H1)pdm09 isolates which can be applied to molecular epidemiology.

Acknowledgments:

We thank the staff of the National Reference Laboratory of Respiratory Virus of Peruvian National Institute of Health: MSc. Nancy Rojas Serrano, Lic. Jannet Otarola Mayhua, Lab. Tech. Sila Ruiton Cueva and Lab. Aux. Emelda Gallardo Cruz

Author contributions:

All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

References:

[1] Fields B *et al. Fields virology.* 5th. Philadelphia: Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
[2] Garten R *et al. Science* 2009 **325:**197 [PMID: 19465683]
[3] Stech J *et al. J. Virol.* 1999 **73:**1878 [PMID: 9971766]
[4] Salazar M *et al. Gac Med Mex.* 2010 **146:**199 [PMID: 20957816]
[5] Wright P *et al.* Orthomyxo viruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5 ed. Philadelphia, PA 19106 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS. 2007 1691.
[6] http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2018/SE042018/04.pdf
[7] Nakamura K *et al. Influenza Other Respir Viruses.* 2017 **11:**399 [PMID: 28792671]
[8] Guldemir D *et al. J Med Virol.* 2019 [PMID: 31389035]
[9] Abed Y *et al. Antiviral Res.* 2018 **159:**26 [PMID: 30219318]
[10] Behillil S *et al. Clin Infect Dis.* 2019 **pii:** ciz904 [PMID: 31538643]
[11] Checkmahomed L *et al. J Infect Dis.* 2019 **pii:** jiz418 [PMID: 31419295]
[12] McKimm-Breschkin JL *et al. Antiviral Res.* 2019 **169:**104542 [PMID: 31233807]
[13] Potdar V *et al. Indian J Med Res.* 2019 **149:**783 [PMCID: PMC6755778]
[14] Hsiao C *et al. Anti Vir Ther.* 2012 **17:**291 [PMID: 22301217]
[15] Hartmann N *et al. Virol J.* 2013 **10:**190 [PMID: 23758742]
[16] Tamburro M & Ripabelli G. *Ann Ig.* 2017 **29:**293 [PMID: 28569339]
[17] Masoudian A *et al. J Hellenic Vet Med Soc.* 2018 **69:** 783.
[18] Lin J *et al. J Clin Microbiol.* 2008 **46:**1090 [PMID: 18174299]
[19] Biswas D *et al. Indian J Med Microbiol.* 2019 **37:**42 [PMID: 31424009]
[20] Lvov DK *et al. Vopr Virusol.* 2019 **64:**63 [PMID: 31412172]
[21] Guldemir D *et al. J Med Virol.* 2019 [PMID: 31389035]
[22] Butera F *et al. J Prev Med Hyg.* 2019 **60:**E1. [PMCID: PMC6477558]
[23] Marcos P *et al. Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2017 **34:**192 [PMID: 29177376]
[24] https://www.saludarequipa.gob.pe/epidemiologia/bole_epi/2016/Bolet_23.pdf
[25] Kalthoff D *et al. Virol J.* 2013 **10:**284. [PMID: 24028349]
[26] Varillas D *et al. J Virol Methods* 2011 **171:**284 [PMID: 20951745]
[27] Curd E *et al. J Virol Methods* 2011 **176:**125 [PMID: 21663763]
[28] Arvia R *et al. Virol J.* 2013 **10:**284 PMC3847122. [PMID: 23499313]
[29] Chen N *et al. J Clin Microbiol.* 2011 **49:**2602. [PMID: 21543559]
[30] Tong SY *et al. PLoS One.* 2011 **6:**e21446 [PMID: 21731753]
[31] Lee HK *et al. J Clin Microbiol.* 2011 **49:**3555 [PMID: 21865430]
[32] Garcia J *et al. Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2013 **30:**157 [PMID: 23612841]
[33] Padilla C *et al. Genome Announc.* 2014 2: [PMID: 24744325]

BIOINFORMATION
Discovery at the interface of physical and biological sciences

OPEN ACCESS GOLD

Edited by P Kangueane

Citation: Lope *et al.* Bioinformation 15(9): 640-645 (2019)

License statement: This is an Open Access article which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. This is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License

since 2005

indexed in

ISSN 0973-2063 (online) 0973-8894 (print)
Bioinformation 15(9): 640-645 (2019)

©Biomedical Informatics (2019)