



Herramientas moleculares utilizadas actualmente para el diagnóstico y caracterización molecular de Arbovirus en Argentina

Simposio: Impacto de las nuevas tecnologías moleculares en el estudio de las Zoonosis Virales emergentes y reemergentes en América . 8 de octubre de 2019

Dra. Cintia Fabbri

División Biotecnología y Bioinformática

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. J.I.Maiztegui”- ANLIS

Centro Colaborador OPS/OMS en Fiebres Hemorrágicas Virales y Arbovirosis. Pergamino-Argentina



Instituto Nacional de
Enfermedades Virales Humanas
“Dr. Julio I. Maiztegui”

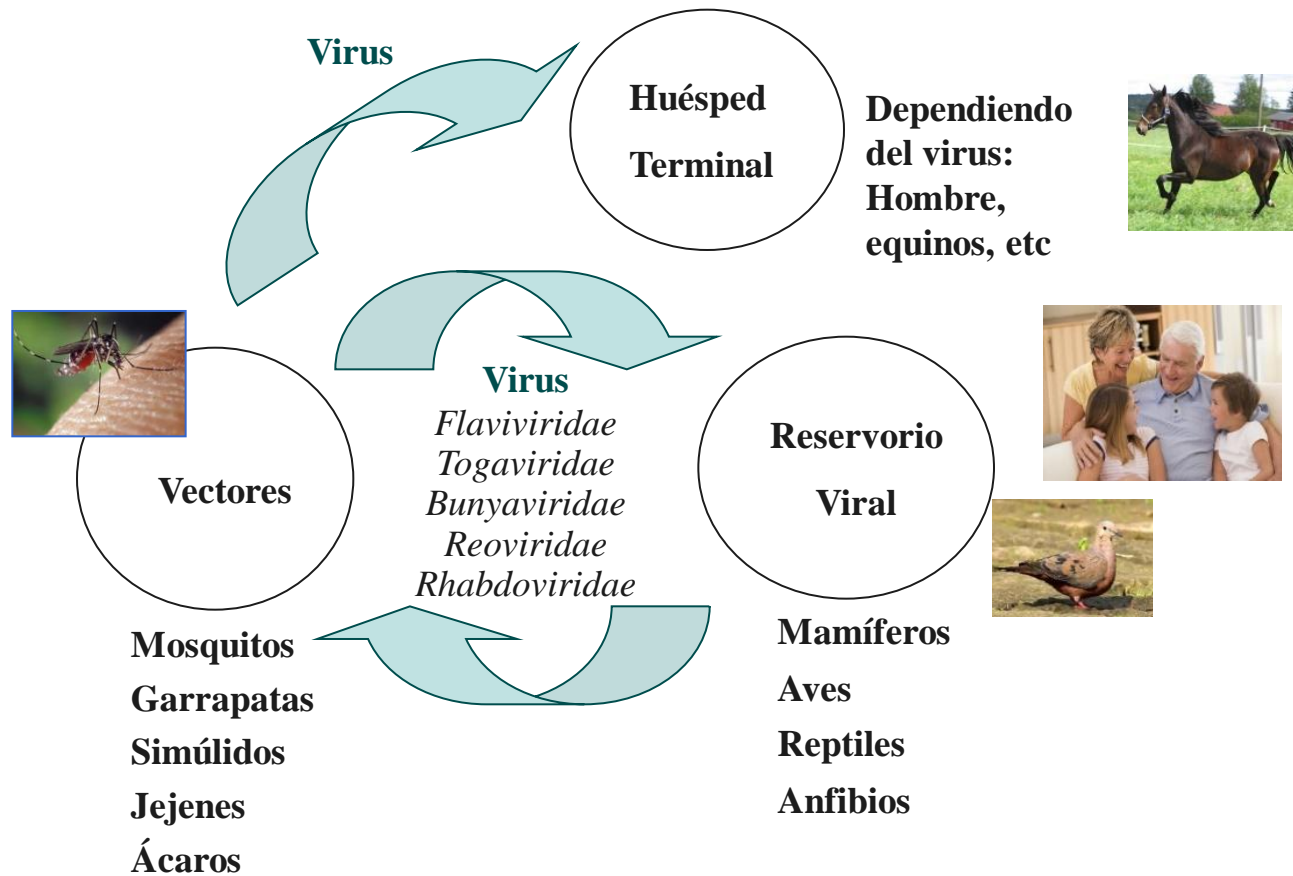


Administración Nacional de
Laboratorios e Institutos de Salud



Ministerio de
Salud
Presidencia de la Nación

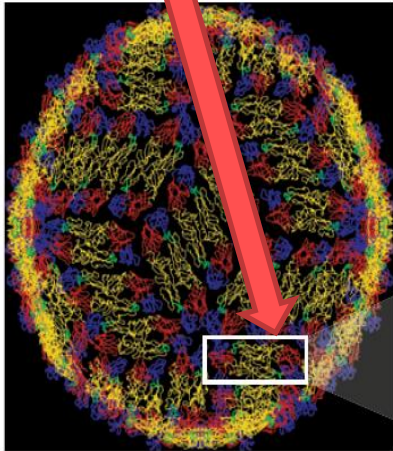
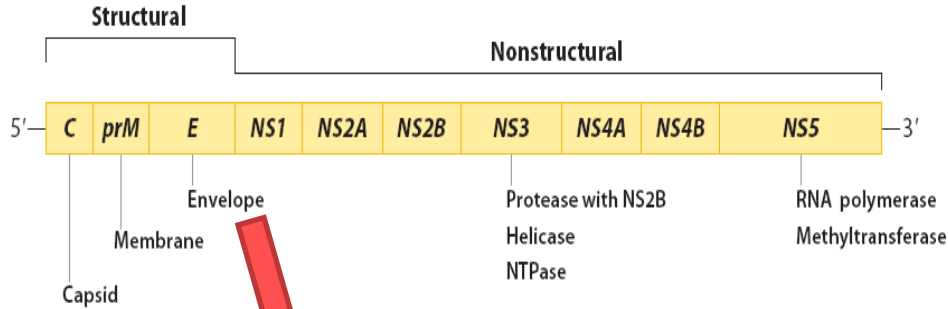
Arbovirus



Diversas familias virales, pero 3 con mayor relevancia en salud pública:

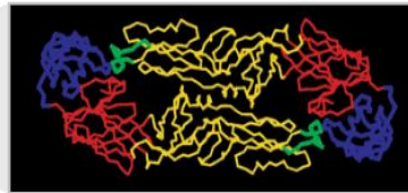
- Familia *Flaviviridae* (Flavivirus: **DENV**, **YFV**, WNV, SLEV, **ZIKV**, ILHV, ROCV)
- Familia *Togaviridae* (Alfavirus: MAYV, **CHIKV**, WEEV, EEEV, VEEV, Aurá, Una)
- Familia *Bunyaviridae* (**OROV**, Cache Valley, Kairi, Las Mayolas, Resistencia, Barranqueras)

Familia: Flaviviridae, Género: Flavivirus



Envelope glycoprotein

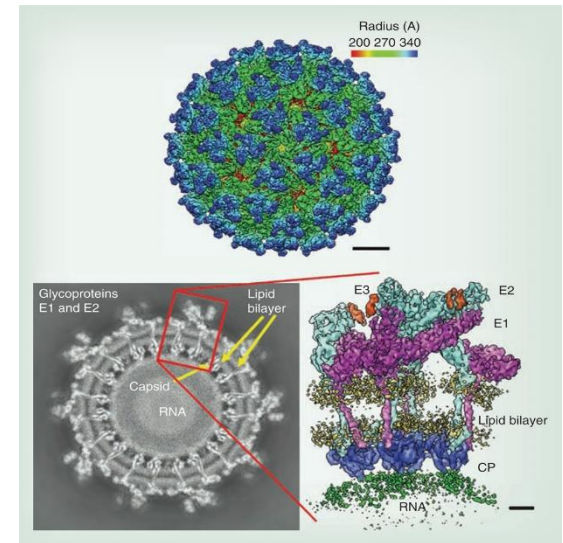
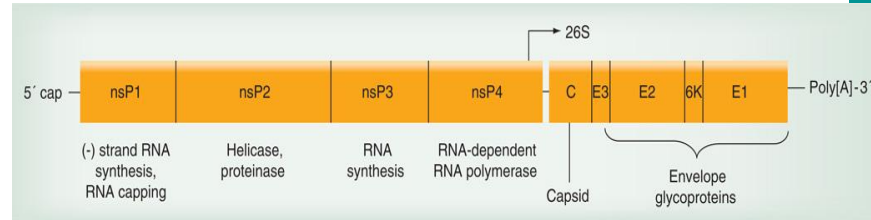
- Red: Domain I – central structure
- Yellow: Domain II – dimerization
- Blue: Domain III – receptor binding
- Green: Fusion peptide



**Dengue , Fiebre Amarilla,
Encefalitis de San Luis,
West Nile, Zika**

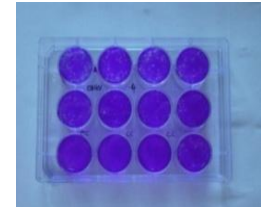
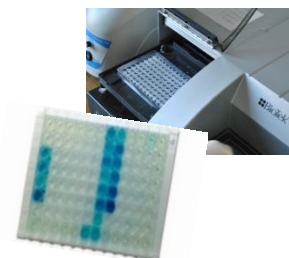
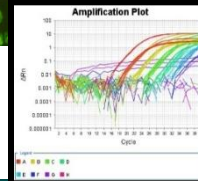
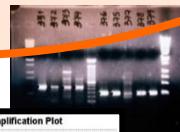
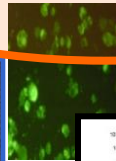
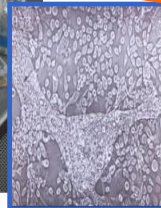
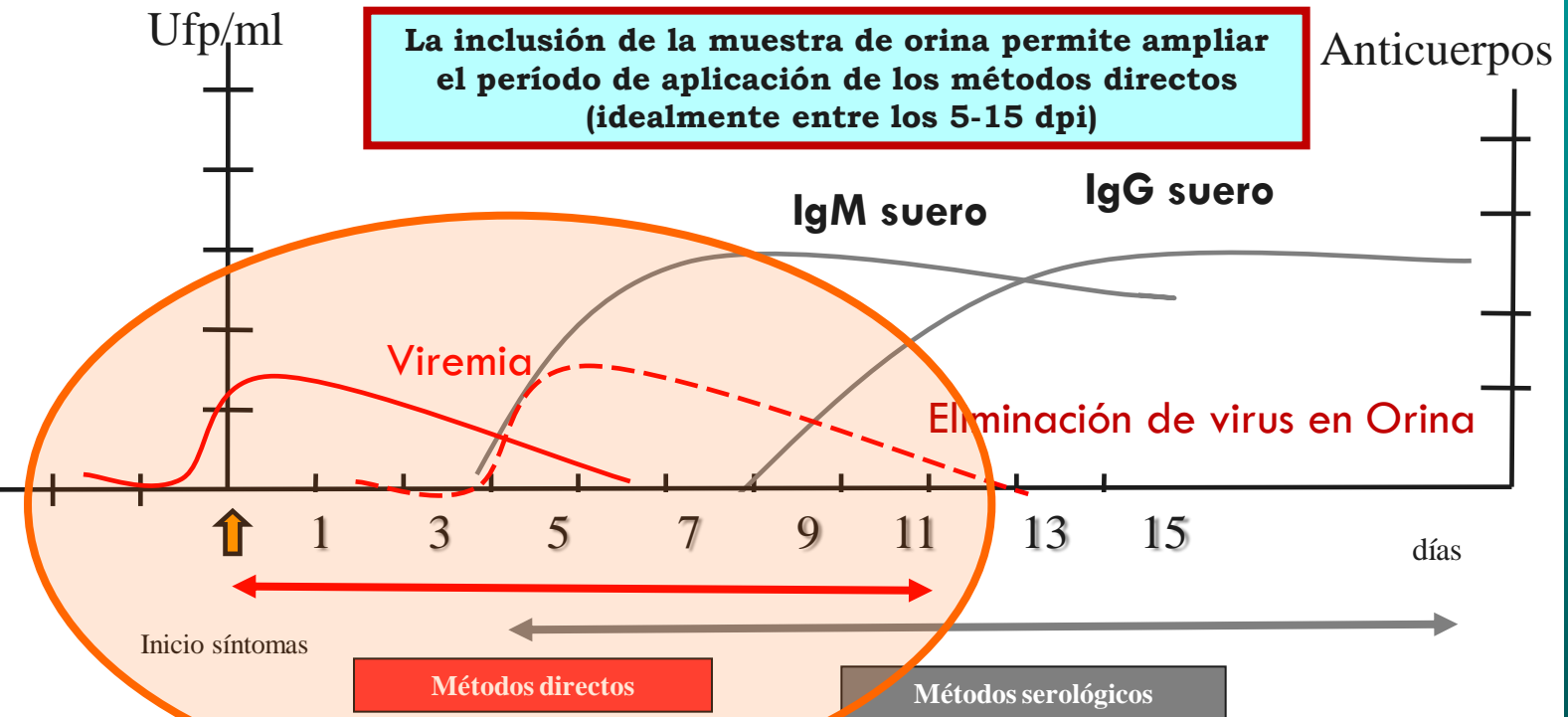
Alta reactividad cruzada de anticuerpos

Familia: Togaviridae Género: Alfavirus



Chikungunya, Encefalitis Equina del Este, Encefalitis Equina del Oeste, Encefalitis Equina Venezolana, Mayaro, Una, Aurá

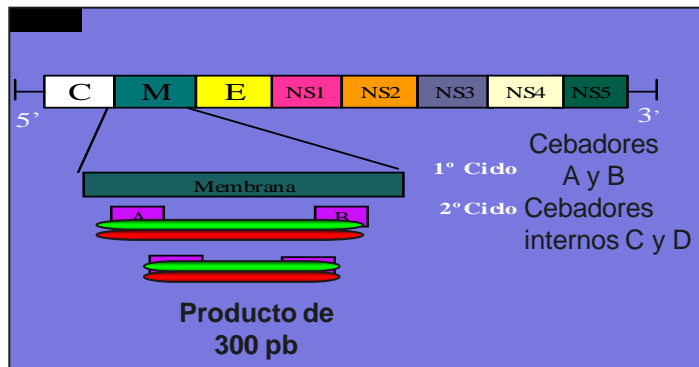
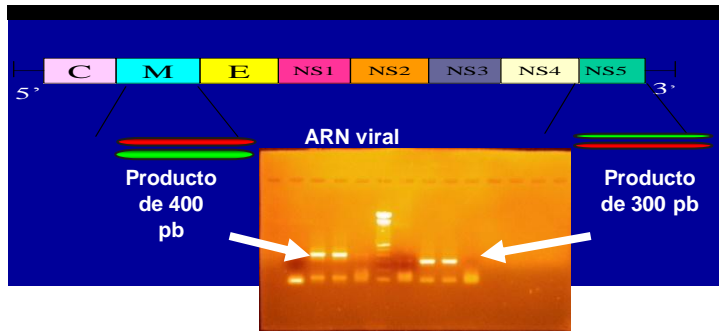
Cinética de la viremia y de los anticuerpos en infecciones por virus Zika



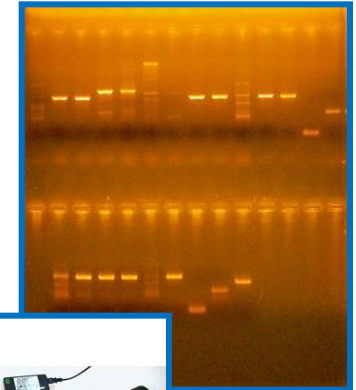
Amplificación y detección del genoma viral mediante técnicas de RT-PCR

Diferentes protocolos de RT-PCR

I. RT-PCR convencional o punto final



- Métodos de 2 ciclos de amplificación (n RT-PCR) tiene mayor sensibilidad



24-48 hs



JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 1992, p. 545-551
0095-1137/92/030545-07\$02.00/0
Copyright © 1992, American Society for Microbiology

Vol. 30, No. 3

Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

ROBERT S. LANCIOTTI,* CHARLES H. CALISHER, DUANE J. GUBLER, GWONG-JEN CHANG, AND A. VANCE VORNDAM†

Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control, P.O. Box 2087, Fort Collins, Colorado 80522

Received 4 September 1991/Accepted 2 December 1991

Short communication

One-step RT-PCR for detection of Zika virus

Oumar Faye^{a,d}, Ousmane Faye^a, Anne Dupressoir^{a,b}, Manfred Weidmann^c, Mady Ndiaye^d, Amadou Alpha Sall^{a,*}

^a Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal

^b UMR8122 CNRS, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif, France

^c Institute of Virology, University of Göttingen, Kreuzbergerring 57, 37075 Göttingen, Germany

^d University Cheikh Anta Diop Dakar, 24 Avenue Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal

Received 12 January 2008; received in revised form 6 May 2008; accepted 11 May 2008

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 110(4): 569–572, June 2015 569

First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil

Camila Zanluca¹, Vanessa Campos Andrade de Melo², Ana Luiza Pamplona Mosimann¹, Glauco Igor Viana dos Santos², Claudia Nunes Duarte dos Santos^{1/+}, Kleber Luz^{3/+}

¹Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, Brasil

²Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil

³Instituto de Medicina Tropical, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil

ORIGINALES

Reliable detection of St. Louis encephalitis virus by RT-nested PCR

Viviana Ré^a, Lorena Spinsanti^a, Adrián Fariñas^a, Adrián Díaz^a, Ana Vázquez^b, Javier Aguilar^a, Antonio Tenorio^b and Marta Contigiani^a

^aInstituto de Virología Dr. J.M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
^bLaboratory of Arboviruses and Imported Viral Diseases, Diagnostic Microbiology Service, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.

Diagnóstico molecular de las infecciones por RT-PCR convencional

JOURNAL OF VIROLOGY, Jan. 1998, p. 73–83
0022-538X/98/\$04.00+0

Vol. 72, No. 1

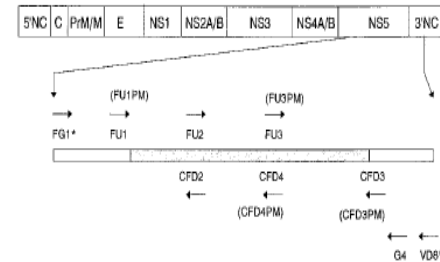
Phylogeny of the Genus *Flavivirus*

GORO KUNO,^{*} GWONG-JEN J. CHANG, K. RICHARD TSUCHIYA, NICK KARABATSOS, AND C. BRUCE CROPP

Arbovirus Diseases Branch, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado 80522-2087

Received 15 July 1997/Accepted 19 September 1997

Genome Organization of the Flavivirus



Journal of Virological Methods 95 (2001) 153–161



Tropical Medicine and International Health
VOLUME 11 NO 9 PP 1431–1441 SEPTEMBER 2006

doi:10.1111/j.1365-3113.2006.01496.x

Detection and subtyping of dengue 1–4 and yellow fever viruses by means of a multiplex RT-nested-PCR using degenerated primers

M. P. Sánchez-Seco^{1,2}, D. Rosario³, L. Hernández³, C. Domingo³, K. Valdés³, M. G. Guzmán³ and A. Tenorio³

¹ Alert and Emergency Unit, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain
² Laboratory of Arboviruses and Imported Viral Diseases, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain
³ Virology Department, PAHO/WHO Collaborating Center for Viral Diseases, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Ciudad Habana, Cuba

Summary

OBJECTIVE Differential diagnosis of infections that cause similar diseases and may be active simultaneously in the same geographical areas is greatly needed. Dengue and yellow fever viruses (DENV and YFV) are transmitted by the same species of mosquito and both can cause haemorrhagic fever symptoms. These viruses are active mainly in regions where expensive and sophisticated technologies are not available. Our objective was to develop a simple, reliable and easy-to-perform method to detect and identify these viruses.
METHODS We slightly modified a generic RT-PCR able to detect the mentioned viruses and other members of this genus specific primers for each one of these viruses were designed and included in the nested reaction instead of one of the generic ones. The reaction was optimized and viruses were amplified giving rise to bands of different sizes distinguishable in agarose gels.



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Virological Methods 124 (2005) 101–109



Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification

M.P. Sánchez-Seco^{a,b,*}, D. Rosario^c, C. Domingo^a, L. Hernández^a, K. Valdés^c, M.G. Guzmán^c, A. Tenorio^a

^a Laboratory of Arboviruses and Imported Viral Diseases, Diagnostic Microbiology Service, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain
^b Alert and Emergency Unit, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain
^c Virology Department, PAHO/WHO Collaborating Center for Viral Diseases, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Ciudad Habana, Cuba

Received 15 September 2003; received in revised form 17 January 2005; accepted 18 January 2005
Available online 2 March 2005

Abstract

Flaviviruses are a widespread and numerous group of arboviruses that can cause serious illness in humans. The continuous and slow spread of certain flaviviruses, such as Dengue viruses, and the recent entry and spread of West Nile virus to the Americas contrast, point to the need to control these infections. This control requires the use of suitable techniques for diagnostic and surveillance programmes. A generic RT-nested-PCR that is theoretically able to detect each member of the group has been designed. The identification of the detected virus is carried out by sequencing. The introduction of an internal control would reduce the number of false negative results and could be used to quantify the viral load in clinical samples where the method works well.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
Keywords: Flavivirus; Generic PCR; Detection; Degenerated primers

A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus

M. Paz Sánchez-Seco^{a,*}, Delfina Rosario^b, Evelia Quiroz^c, Guadalupe Guzmán^b, Antonio Tenorio^a

^a Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Ciudad Habana, Cuba

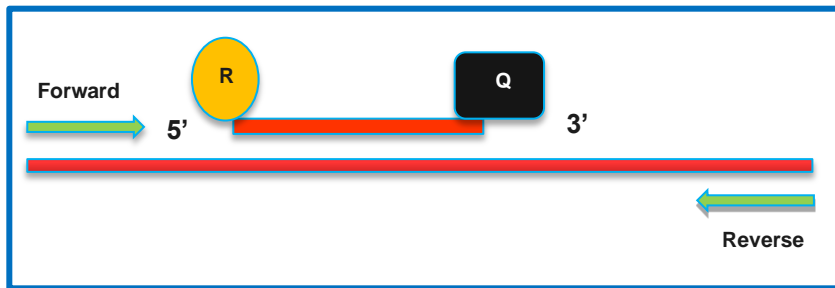
^c Departamento de Virología, Centro Conmemorativo Gorgas de Investigación e Información en Salud, Panama, Panama

Received 31 October 2000; received in revised form 6 March 2001; accepted 13 March 2001

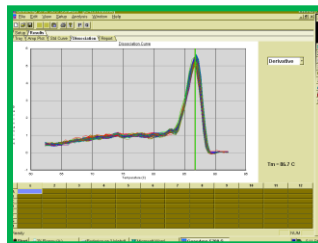
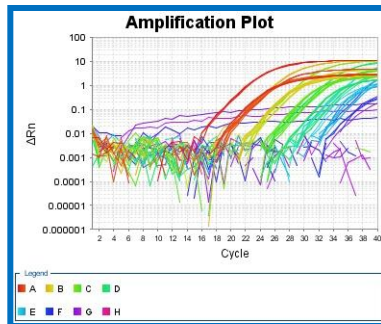
Amplificación y detección del genoma viral mediante técnicas de RT-PCR

Diferentes protocolos de RT-PCR

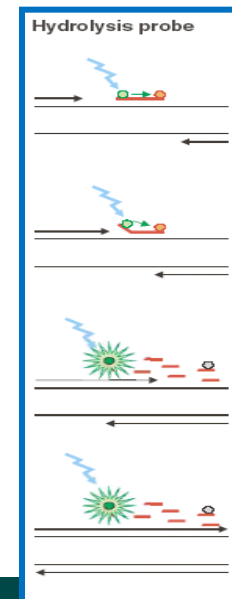
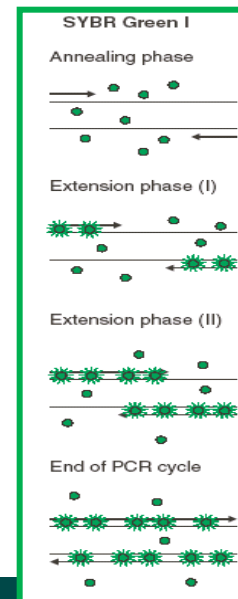
II. RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR)

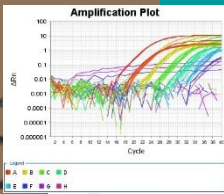


- ✓ Menor probabilidad de contaminación
- ✓ Mayor Sensibilidad y Especificidad
- ✓ Sondas de hidrólisis tienen mayor especificidad que técnicas son SyBR Green y son utilizadas para el dx



2-4 hs





Diagnóstico molecular de las infecciones por Arbovirus por qRT-PCR

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus

Gilberto A. Santiago, Edgardo Vergne, Yashira Quiles, Joan Cosme, Jesus Vazquez, Juan F. Medina, Freddy Medina, Candimar Colón, Harold Margolis, Jorge L. Muñoz-Jordán*

Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector-Borne Diseases, Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico, United States of America

PLOS Neglected Tropical Diseases | www.plosntds.org

1

July 2013 | Volume 7 | Issue 7 | e2311

- Metodología desarrollada por CDC y aprobada por FDA
- Amplificación en distintas regiones del genoma para cada uno de los serotipos
- Metodología multiplex, igual sensibilidad que singleplex

qRT-PCR CHIKV

Sets de primer y sondas

• **Set 1 (ECSA)**
6856F
6981c
6919-FAM

• **Set 2 (Asiático-América)**
3855F
3957c1,2
3996-FAM1,2

• **Set 3 (Asiático-América)**
856F
962c
908-FAM

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 8, August 2008

Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007

Robert S. Lanciotti,* Olga L. Kosoy,* Janean J. Laven,* Jason O. Velez,* Amy J. Lambert,* Alison J. Johnson,* Stephanie M. Stanfield,* and Mark R. Duffy*

Table 3. Description and performance characteristics of Zika virus real-time RT-PCR primer/probe sets*

Primer	Genome position†	Sequence (5' → 3')	Sensitivity, no. copies	Specificity‡
ZIKV 835	835–857	TTGGTCATGACTGCTGATTGC	100	ZIKV
ZIKV 911c	911–890	CCTTCACAAGTCCCTATTGC		
ZIKV 860-FAM	860–886	CGGCATACAGGATCAGGTGCATAGGAG		
ZIKV 1086	1086–1102	CCGCTGCCCAACACAAG	25	ZIKV
ZIKV 1162c	1162–1139	CCACTAAGCTCTTTTGAGACAT		
ZIKV 1107-FAM	1107–1137	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA		

qRT-PCR YFV

- Amplificación del genoma en la región del gen C
- Diferenciación de cepas silvestre de vacunal

qRT-PCR para virus de la Encefalitis de San Luis

• Hull *et al.*, *Diagn Microbiol Infect Dis*, Nov. 2008, p272-279 Vol. 63, N° 3

- Confirmación de un caso fatal en 2013 en biopsia de cerebro y en muestra de suero en contacto de caso confirmado de SLE en brote de Pergamino, 2015

qRT-PCR para virus West Nile

• Lanciotti *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2000, p. 4066–4071 Vol. 38, N° 1

Estudio por qRT-PCR en muestra de distintas partes del cerebro (cerebelo, hemisferio y puente) del equino con sintomatología

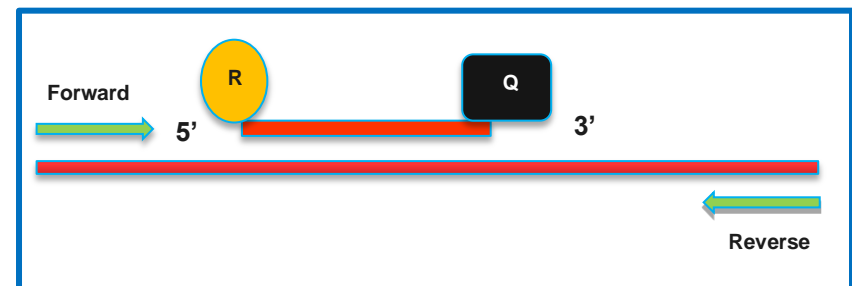
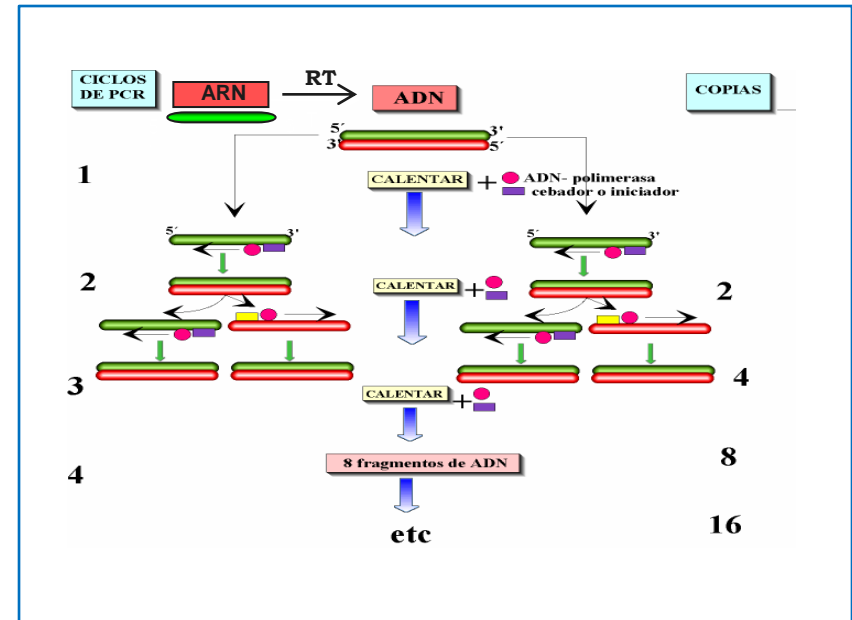
Amplificación y detección del genoma viral mediante técnicas de RT-PCR

Diferentes diseños de RT-PCR

✓ **Específicos:** diseñados en regiones que permiten diferenciar entre los distintos virus (Ejemplo gen de la Envoltura para virus Zika)

✓ **Genéricos:** diseñados en regiones más conservadas dentro del género viral (Ejemplo gen NS5 para Flavivirus)

✓ **Singleplex o multiplex:** diseñados para la utilización de un único par de oligonucleótidos o múltiples pares



qRT-PCR para virus Dengue

- Amplificación en distintas regiones del genoma para cada uno de los serotipos
- **La secuencia de sondas y oligonucleótidos fueron diseñados en base a cepas de DENV de circulación reciente (1998-2012)**

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus

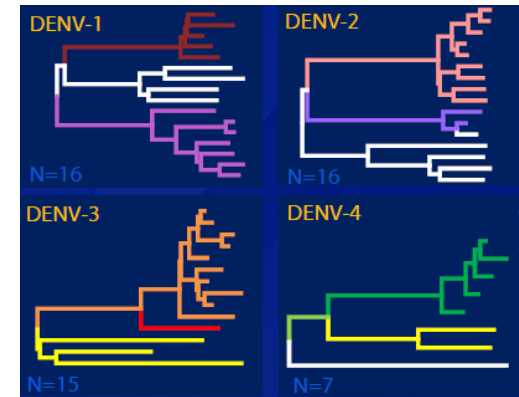
Gilberto A. Santiago, Edgardo Vergne, Yashira Quiles, Joan Cosme, Jesus Vazquez, Juan F. Medina, Freddy Medina, Candimar Colón, Harold Margolis, Jorge L. Muñoz-Jordán*

Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector-Borne Diseases, Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico, United States of America

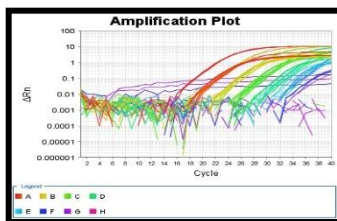
PLOS Neglected Tropical Diseases | www.plosntds.org

1

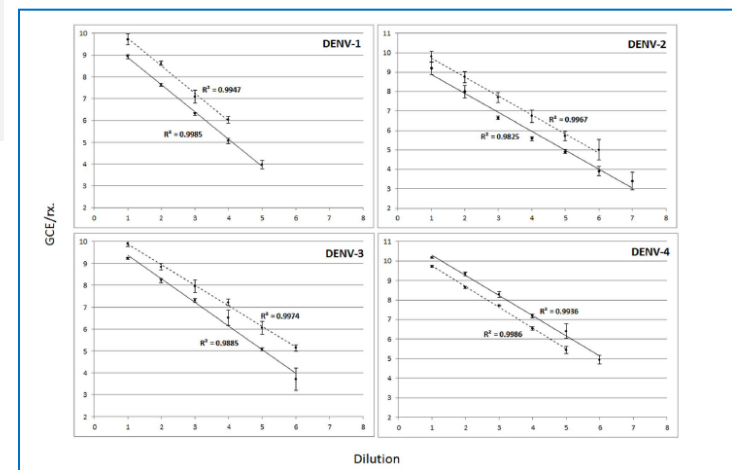
July 2013 | Volume 7 | Issue 7 | e2311



Nombre	Marcador de fluorescencia
DENGUE 1	FAM
DENGUE 2	VIC
DENGUE 3	ROJO TEXAS
DENGUE 4	CY5



Regresión lineal para evaluación de sensibilidad

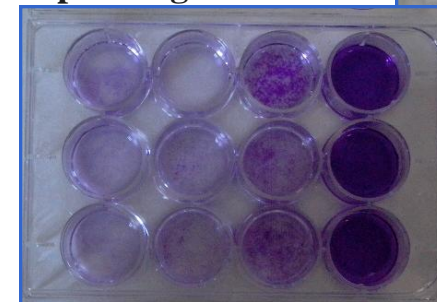
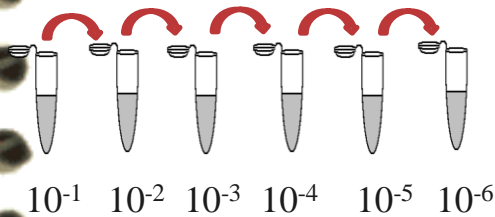


Evaluación de la sensibilidad analítica de las metodologías usadas

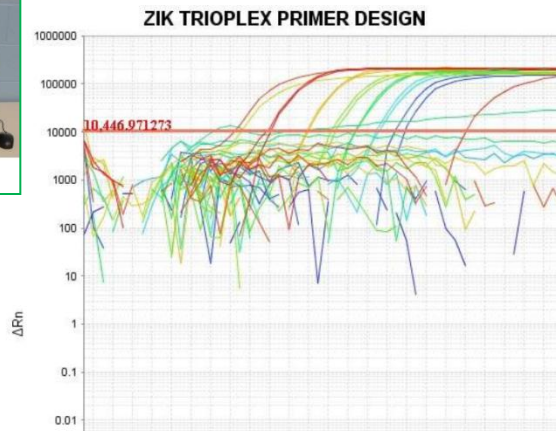
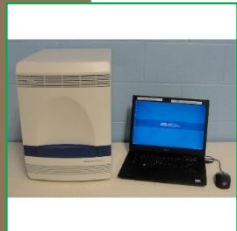
Semillas virales

Extracción de RNA

Titulación Viral bajo capa de agarosa



qRT-PCR



Virus	Título UFP/ml
DEN-1	1,1 10 ⁶
DEN-2	3,45 10 ⁶
DEN-3	6,13 10 ⁵
DEN-4	9,3 10 ⁵
CHIK	3 10 ⁶
ZIK	5,8 10 ⁶

Evaluación de la sensibilidad analítica de 3 reactivos para dx de Dengue, Chikungunya y Zika (multiplex kit) vs protocolos in house

Virus	Sensibilidad (UFP/ml) protocolo in house actualmente en uso en la Red	Sensibilidad (UFP/ml) TRIOPLEX CDC	Sensibilidad (UFP/ml) Kit Primer Design	Sensibilidad (UFP/ml) Kit Roche
DEN-1	0,01	0,1	1,1	0,01
DEN-2	0,03	0.3	3,5	No hecho
DEN-3	0.01	0.1	6,1	No hecho
DEN-4	0.01	0.1	0,93	No hecho
CHIK	3	0.3	3	3
ZIK	0,06	0.06	5.8	0.6

- ✓ La Sensibilidad para CHIKV es similar a la obtenida con protocolo “in house” para los métodos evaluados
- ✓ La sensibilidad para DENV y ZIKV es inferior respecto de la del protocolo “in house” para los reactivos comerciales evaluados
- ✓ La disminución en las Se podría sería más riesgoso de obtener falsos negativos para ZIKV ya que éste agente presenta baja viremia en los pacientes.

EVALUATION OF MULTIPLEX REAGENTS FOR DETECTION OF DENGUE, CHIKUNGUNYA AND ZIKA VIRUSES BY REAL-TIME RT-PCR

Autores ¹ Cintia Fabbri ¹, Mariel Feroci ¹, Victoria Luppo ¹, Silvana Levis ¹, Maria Alejandra Morales

<https://www.eventoexpress.com.br/sig/2018/virologia>

qRT-PCR para virus Chikungunya

DISPATCHES

Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006

Robert S. Lanciotti,* Olga L. Kosoy,* Janeen J. Laven,* Amanda J. Panella,* Jason O. Velez,* Amy J. Lambert,* and Grant L. Campbell*

Chikungunya virus (CHIKV), a mosquito-borne alpha-virus, is endemic in Africa and Asia. In 2005–2006, CHIKV epidemics were reported in islands in the Indian Ocean and in southern India. We present data on laboratory-confirmed CHIKV infections among travelers returning from India to the United States during 2006.

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 13, No. 5, May 2007

Sets de *primer* y sondas

- **Set 1 (ECSA)**

6856F
6981c
6919-FAM

- **Set 2 (Asiático-América)**

3855F
3957c1,2
3996-FAM1,2

- **Set 3 (Asiático-América)**

856F
962c
908-FAM

Límite de detección

(cepa americana):

- **Set 1** (genotipo ECSA): 56 ufp/ml
- **Set 2** (genotipo asiático-americano): 5,6 ufp/ml
- **Set 3** (genotipo asiático-americano): 5,6 ufp/ml

- Desarrollada por el Dr. Lanciotti (2007)
- Diseño de sonda y primer en base a la cepa prototipo S27, detecta todos los genotipos West África, ECSA y Asia
- Luego de la introducción de CHIKV al continente americano se han diseñado nuevos sets de sondas y primer (Fort Collins- CDC) para la detección del genotipo asiático (cepa americana)
- Reacciones *singleplex*

Evaluación de la sensibilidad analítica de 3 protocolos in house para dx de YFV

- ✓ Para comparar los límites de detección se procesaron diluciones seriadas (factor 10) de dos cepas de referencia (silvestre y vacunal) realizando extracciones del RNA y al mismo tiempo, cuantificación viral (UFP/ml, VERO C76).
- ✓ Se compararon 3 protocolos, uno de ellos desarrollado para amplificar selectivamente cepa silvestre o vacunal. (Fischer C. y cols, Emerg Infect Dis. 2017, Nov; 23:11).

Cepa Vacunal 17D				
Dilución	UFP (5 ul)	Protocolo Domingo	Protocolo Fisher	Protocolo Johnson
		Ct	Ct	Ct
-1	$2.2 \cdot 10^3$	15.4	13.6	16.3
-2	$2.2 \cdot 10^2$	19.5	17.2	20.3
-3	$2.2 \cdot 10^1$	22.5	20.4	24.5
-4	2.2	25.9	23.6	28.4
-5	$2.2 \cdot 10^{-1}$	30	28.5	31.6
-6	$2.2 \cdot 10^{-2}$	34.3	31.9	35.0
-7	$2.2 \cdot 10^{-4}$	36.8	36.2	37.8
-8	$2.2 \cdot 10^{-5}$	37.5	NEG	NEG
Cepa silvestre 2008				
Dilución	UFP (5 ul)	Protocolo Domingo	Protocolo Fisher	Protocolo Johnson
		Ct	Ct	Ct
-1	$1,75 \cdot 10^3$	14.3	16.7	12.1
-2	$1,75 \cdot 10^2$	17.8	20.8	15.8
-3	$1,75 \cdot 10^1$	20.0	22.1	20.0
-4	1.75	25.2	27.3	24.0
-5	$1,75 \cdot 10^{-1}$	28.5	30.7	28.4
-6	$1,75 \cdot 10^{-2}$	33.2	35.0	31.3
-7	$1,75 \cdot 10^{-3}$	35.0	NEG	34.2
-8	$1,75 \cdot 10^{-4}$	NEG	NEG	NEG

¿Que estrategia es mejor?

- ✓ Dependerá de la situación epidemiológica
- ✓ De los resultados que se obtengan
- ✓ De la disponibilidad de metodologías en el laboratorio

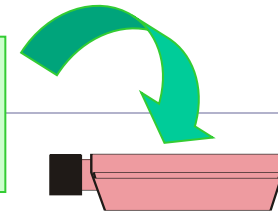


Aunque tienen muchas ventajas las técnicas en tiempo real, las metodologías de RT-PCR convencional son aún sumamente útiles (caracterización genética) y tienen menor costo

nRT-PCR virus Dengue y Fiebre Amarilla



Muestras de Hígado,
riñón, cerebro y
suero (-70°C)



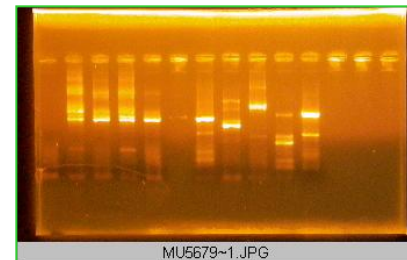
Células VERO – C6/36



ECP

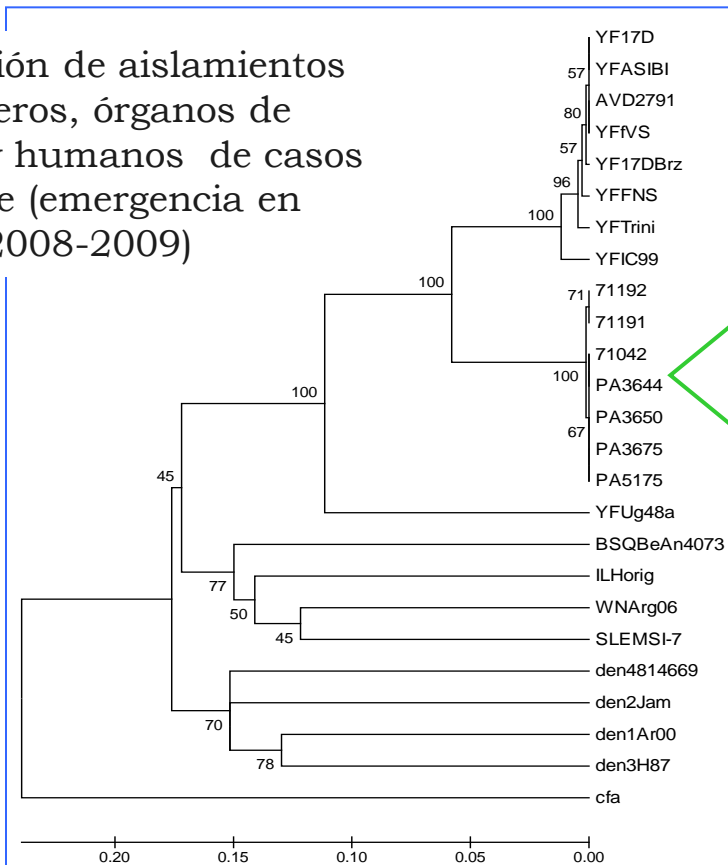
Extracción de RNA

nRT-PCR



Bandas específicas para YFV

Identificación de aislamientos virales, sueros, órganos de animales y humanos de casos YF silvestre (emergencia en Argentina 2008-2009)



Humanos y
*Alouatta
caraya*,
Argentina,
2007-2008

Utilidad de la caracterización molecular para diferenciación de cepas silvestres y vacunales de Fiebre amarilla

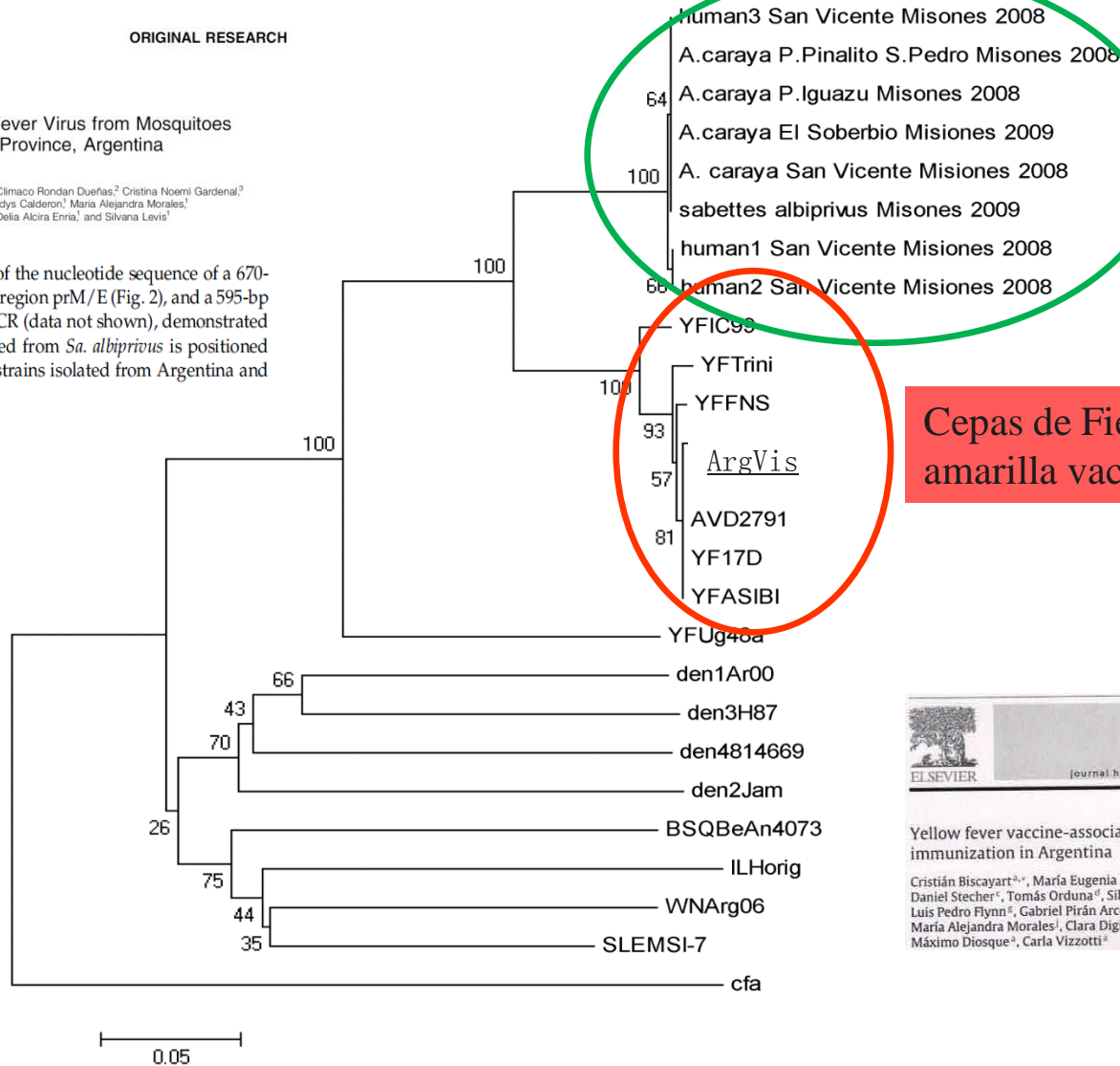
VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES
Volume 12, Number 11, 2012
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/vbz.2011.0730

ORIGINAL RESEARCH

Isolation of Yellow Fever Virus from Mosquitoes in Misiones Province, Argentina

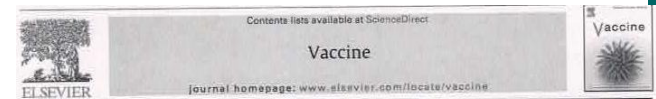
Silvina Goenaga,¹ Cintia Fabbri,¹ Juan Climaco Rondan Dueñas,² Cristina Noemí Gardenal,² Gustavo Carlos Rossi,⁴ Gladys Calderon,¹ María Alejandra Morales,¹ Jorge Braulio García,¹ Delia Alcira Enría,¹ and Silvana Levis¹

The Bayesian analysis of the nucleotide sequence of a 670-bp fragment of a genomic region prM/E (Fig. 2), and a 595-bp fragment of the NS5/3'NCR (data not shown), demonstrated that the YFV strain isolated from *Sa. albiprivus* is positioned together with other YFV strains isolated from Argentina and Brazil in 2008.



Cepas de Fiebre amarilla silvestres
Genotipo I

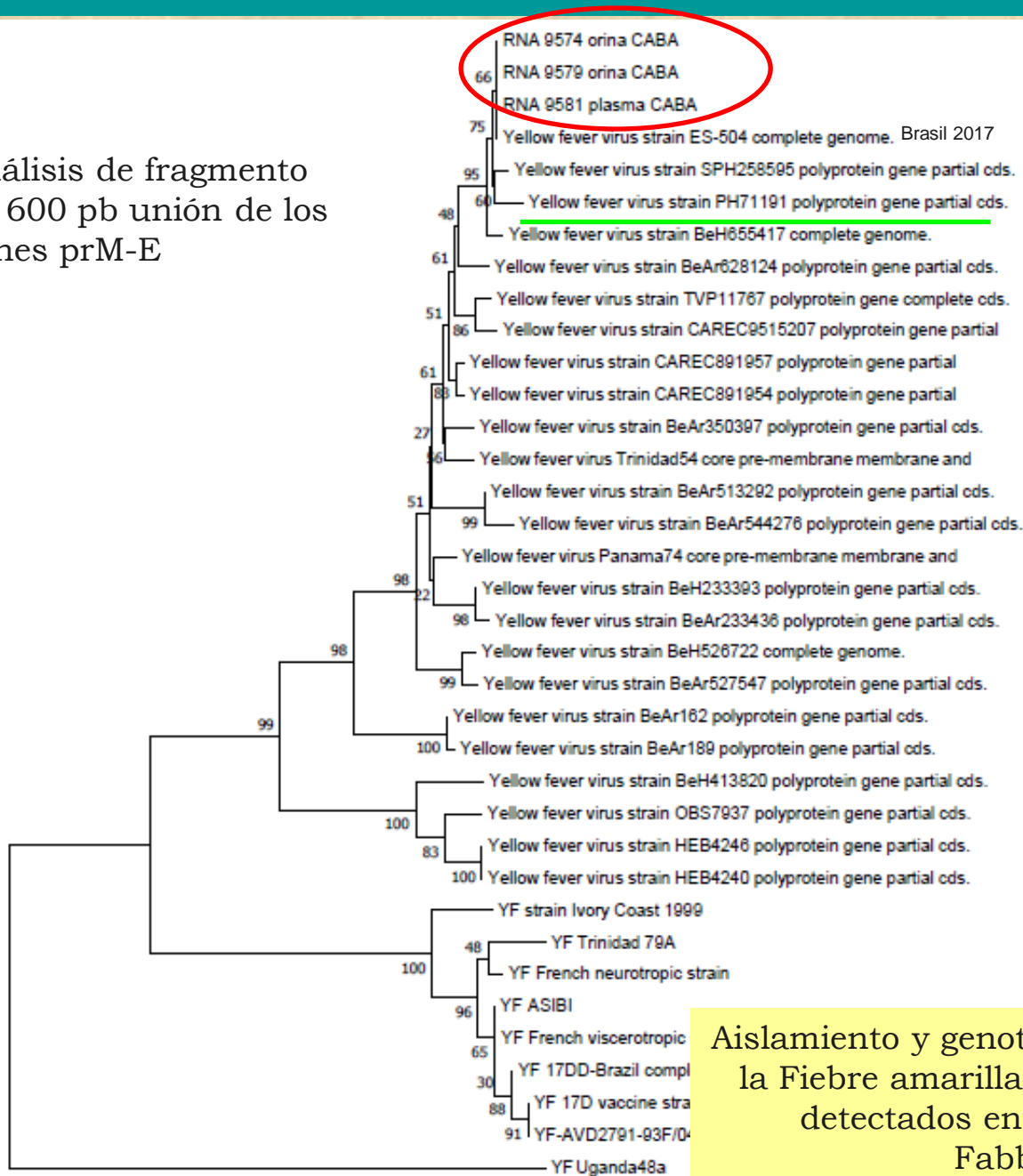
Cepas de Fiebre amarilla vacunales



Yellow fever vaccine-associated adverse events following extensive immunization in Argentina

Cristián Biscayart^{a,*}, María Eugenia Pérez Carrega^a, Sandra Sagradini^a, Ángela Gentile^b, Daniel Stecher^c, Tomás Orduna^d, Silvia Bentancourt^e, Salvador García Jiménez^f, Luis Pedro Flynn^g, Gabriel Pirán Arce^h, María Andrea Uboldiⁱ, Laura Bugna^f, María Alejandra Moralesⁱ, Clara Digillo^j, Cintia Fabbri¹, Delia Enría¹, Máximo Diosque^a, Carla Vizzotti^a

Análisis de fragmento
de 600 pb unión de los
genes prM-E



América
del sur
genotipo I

América
del sur
genotipo II

Aislamiento y genotipificación del virus de
la Fiebre amarilla en casos importados
detectados en Argentina, 2018.

Fabbri et. al.

Congreso Argentino de Zoonosis, 2018

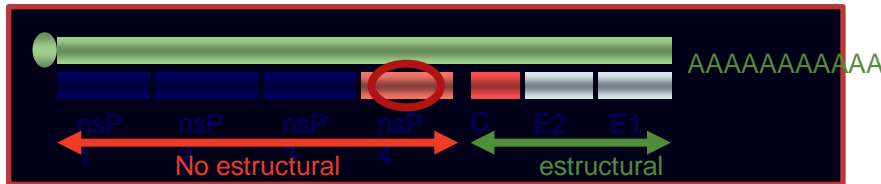
CHIKV: Secuenciación genómica parcial gen nsP4 amplificado con el protocolo genérico



Journal of Virological Methods 95 (2001) 153–161

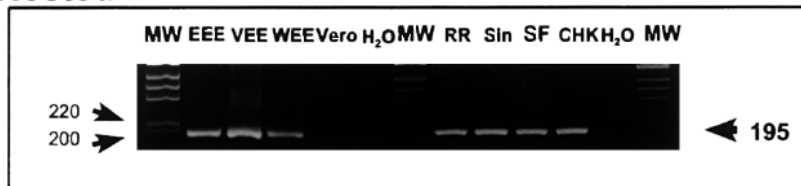


- ✓ Oligonucleótidos degenerados en la región nsP4 (195pb)



- ✓ Detección de EEE, WEE, VEE, CHIK, Ross River, Sinbis, Semiliki Forest

Nested



- ✓ Para identificar el *Alphavirus* se requiere la secuenciación genómica

A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus

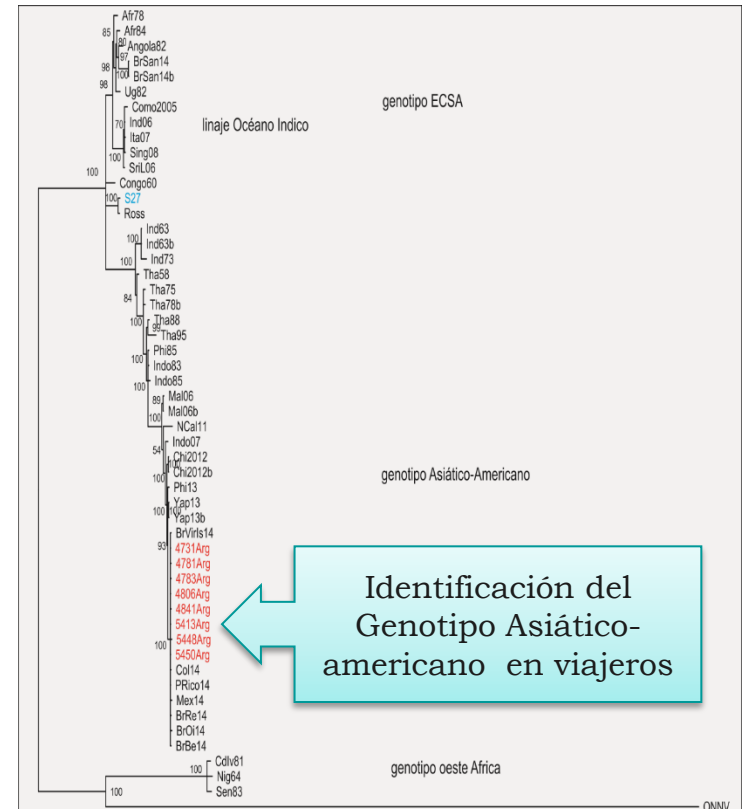
M. Paz Sánchez-Seco ^{a,*}, Delfina Rosario ^b, Evelia Quiroz ^c,
Guadalupe Guzmán ^b, Antonio Tenorio ^a

^a Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Ciudad Habana, Cuba

^c Departamento de Virología, Centro Comemorativo Gorgas de Investigación e Información en Salud, Panamá, Panamá

Received 31 October 2000; received in revised form 6 March 2001; accepted 13 March 2001



Caracterización genética de cepas de virus Zika circulantes en argentina, 2016

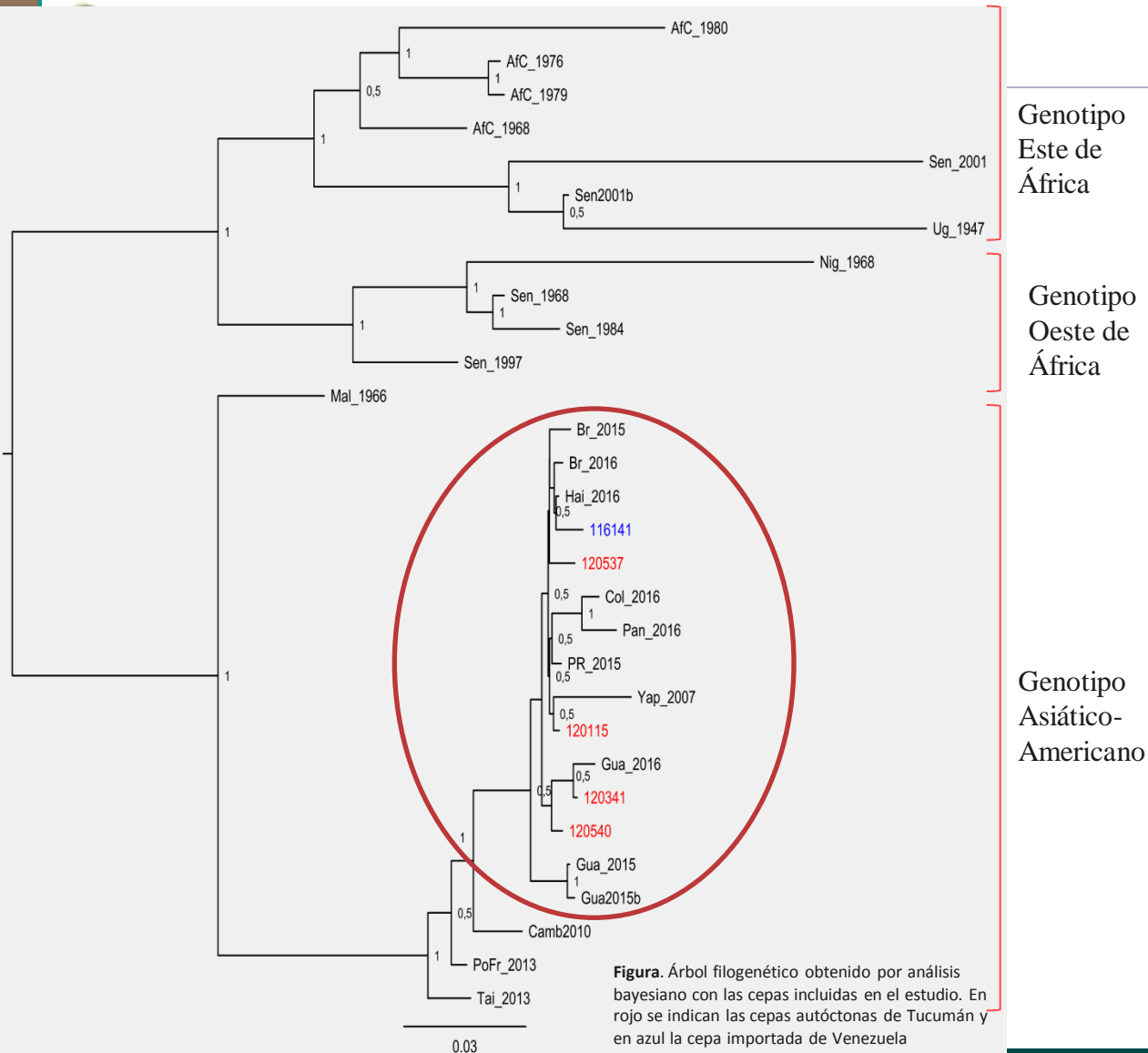
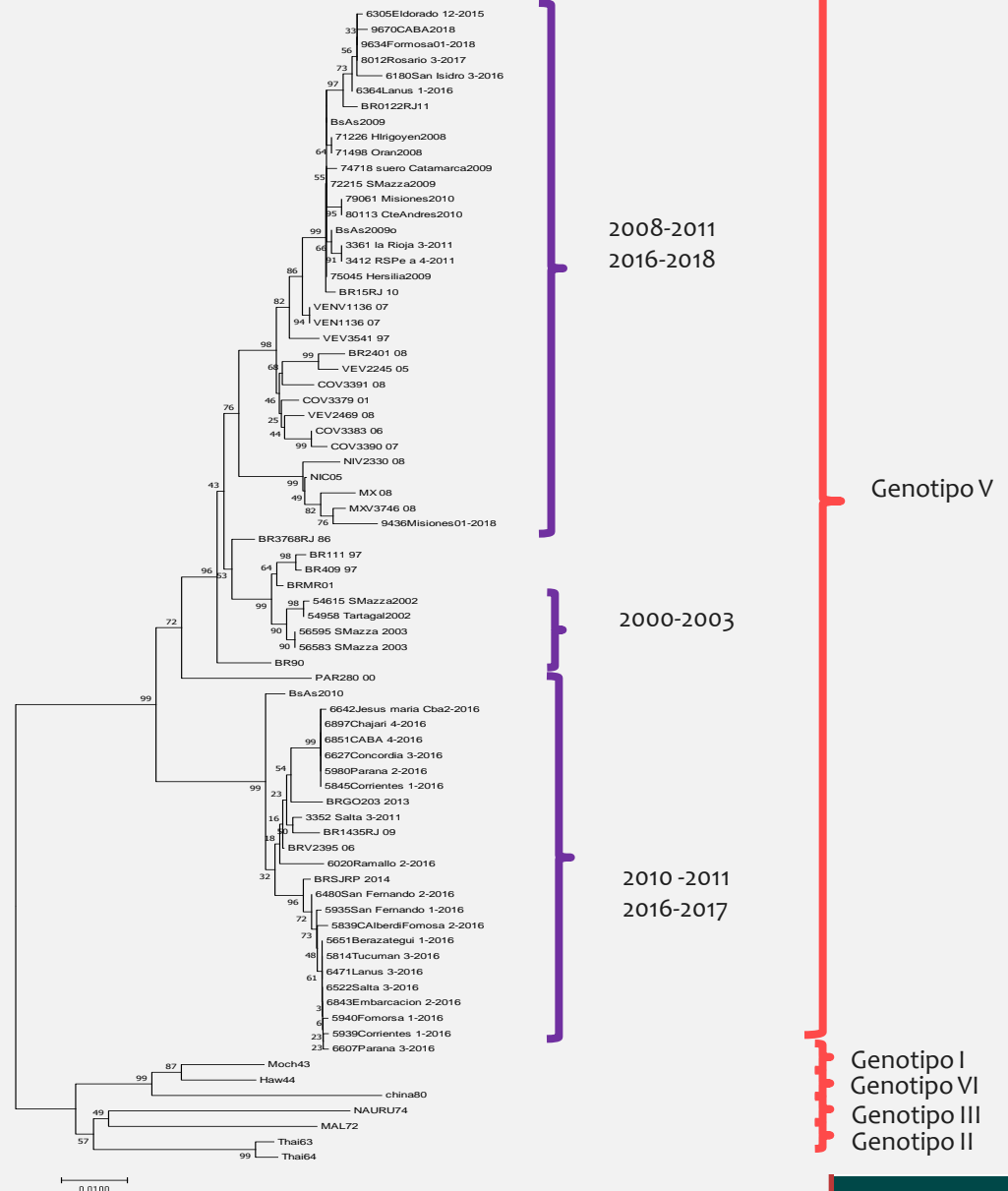


Figura. Árbol filogenético obtenido por análisis bayesiano con las cepas incluidas en el estudio. En rojo se indican las cepas autóctonas de Tucumán y en azul la cepa importada de Venezuela

- ✓ Las muestras analizadas agrupan en el mismo *cluster* con cepas correspondientes al genotipo Asiático de ZIKV que se encuentra actualmente circulando en el continente Americano.
- ✓ Se observó 99,8-100 % de identidad nucleotídica entre las cepas de circulación autóctona en el fragmento analizado.

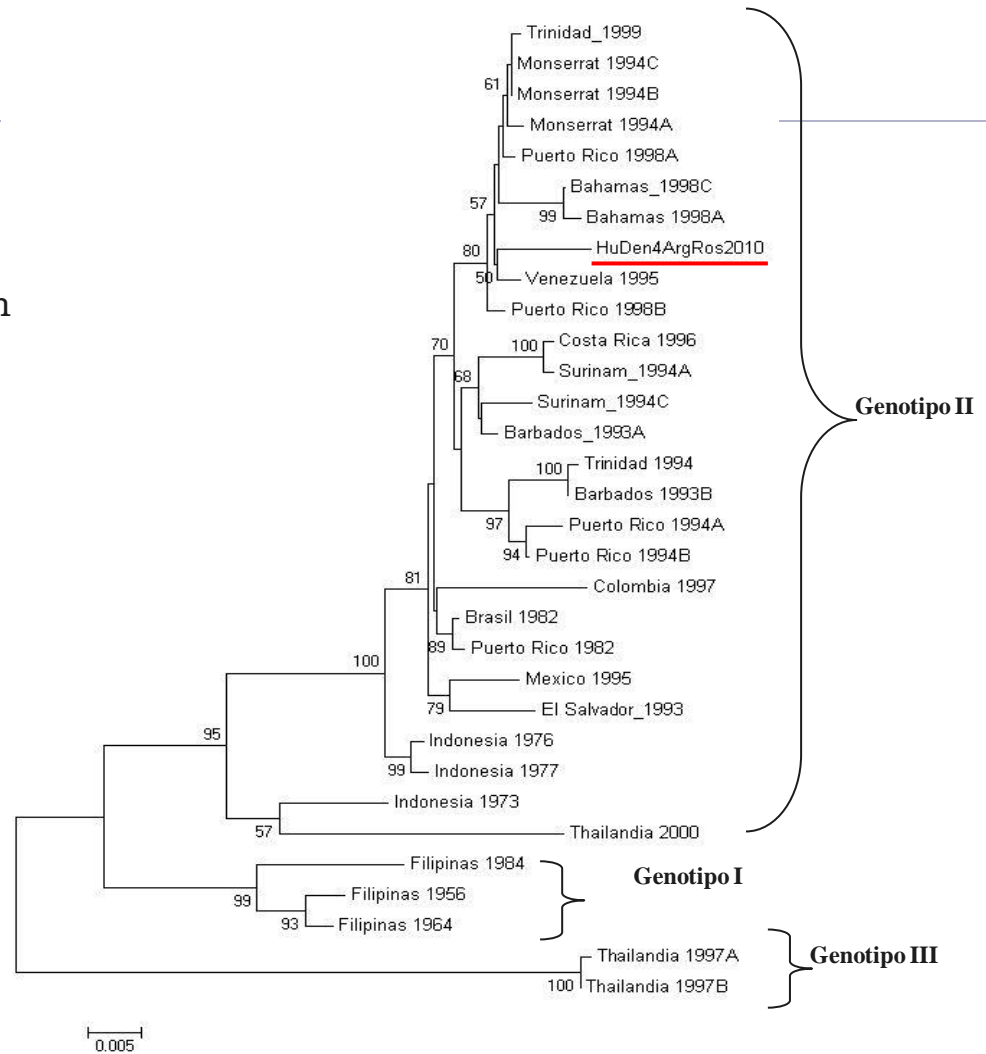
Genotipificación de DENV-1 (fragmento de 1500 pb, gen ENV)

- Se ha detectado el genotipo V de DENV-1 en todas las cepas estudiadas.
- La dinámica de DENV-1 en Argentina se ha caracterizado por introducciones, expansión geográfica y desplazamientos de distintos linajes reflejando, fundamentalmente, lo que sucede en el resto de los países de Latinoamérica



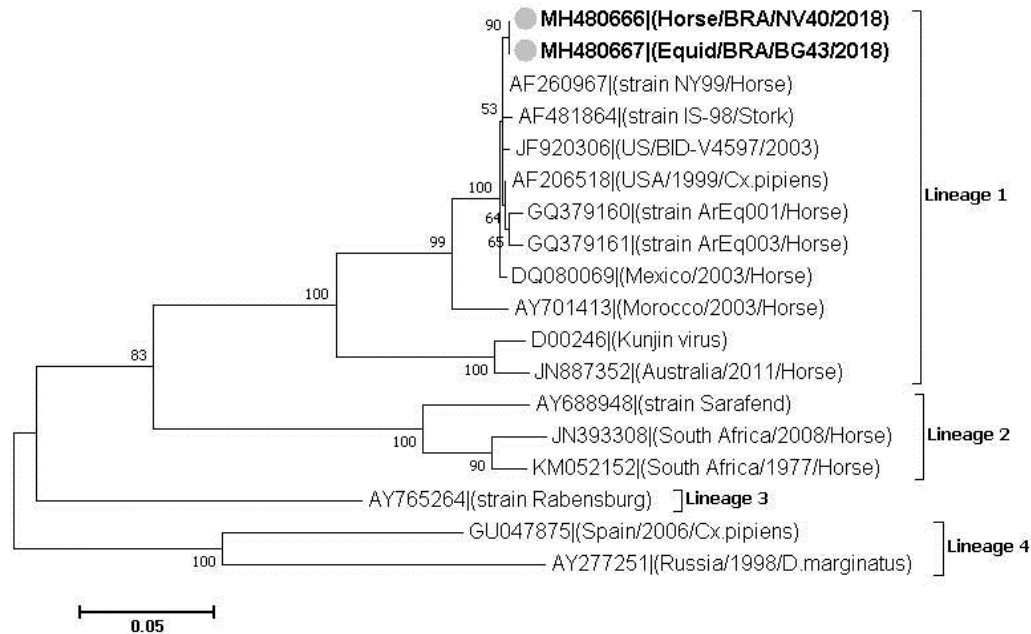
Genotipificación de DENV-4 (fragmento de 1500 pb, gen ENV)

Se ha detectado el genotipo II de DENV-4 en todas las cepas estudiadas desde su introducción en Argentina en 2010



WNV detectado en Brasil en 2018

- Utilizaron el protocolo de RT-PCR genérico (Fulop et al., 1993 y Bronzoni et al., 2005 (NS5))
- Identificaron 4 animales positivos
- Abril 2018, Estado de Epiritu Santo, Brasil



[Transbound Emerg Dis.](#) 2018 Oct 14. **West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018.** Silva ASG1, Matos ACD1, da Cunha MACR2, Rehfeld IS1, Galinari GCF1, Marcelino SAC1, Saraiva LHG1, Martins NRDS1, Maranhão RPA1, Lobato ZIP1, Pierezan F1, Guedes MIMC1, Costa EA1.

Conclusiones

- § El diagnóstico molecular es una herramienta útil para el diagnóstico de Arbovirus aplicando las metodologías en el período agudo de la enfermedad.
- § Pueden existir variantes virales que no son detectadas por los métodos ya establecidos, por lo tanto el diseño de oligonucleótidos y sondas es crítico, así como también la evaluación de la Se y Sp de las metodologías empleadas
- § Las técnicas de RT-PCR en tiempo real tienen muchas ventajas en comparación con las metodologías de RT-PCR convencional, pero estas últimas son aún sumamente útiles ya que permiten la caracterización genética
- § Los protocolos genéricos son útiles para vigilar agentes emergentes

**.....MUCHAS
GRACIAS POR
SU ATENCIÓN!!**

