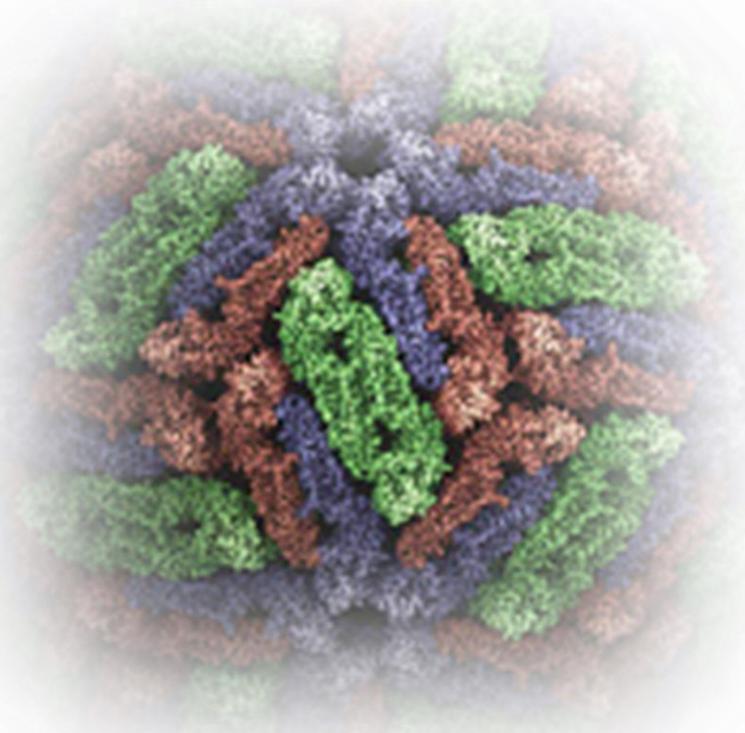


Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

Aislamiento de cepas de virus Dengue autóctono e importado en cultivos celulares y su caracterización molecular



Gastón Lamarque

Tutora

Dra. Adriana Delfraro

Co-Tutora

Dra. Sandra Frabasile

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

2019

Índice

• ABREVIATURAS	4
• RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1.1 Grupo <i>Arbovirus</i>	7
1.2 Flavivirus.....	9
1.2.1 Taxonomía.....	9
1.3 Dengue virus.....	10
1.3.1 Orígenes de DENV.....	10
1.3.2 Taxonomía.....	11
1.3.3 Estructura.....	12
1.3.4 Ciclo de replicación.....	13
1.3.5 Respuesta inmune innata.....	14
1.3.6 Respuesta inmune adaptativa.....	16
1.3.7 Epidemiología de DENV.....	16
1.3.8 Transmisión.....	17
1.3.9 DENV en las Américas.....	18
1.3.10 Situación de DENV en Uruguay.....	20
1.3.11 Fases de la enfermedad.....	20
• 2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo general.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
• 3. ESTRATEGIA DE TRABAJO	23
• 4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Preparación de células C6/36 para infección con sueros humanos.....	24
4.2 Preparación de los sueros e inoculación en monocapa.....	24
4.3 Preparación de stock de virus.....	24
4.4 Segundo pasaje.....	25
4.5 Extracción de ARN mediante Kit QIAamp y Trizol.....	25
4.6 Retrotranscripción y Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	25
4.7 Análisis de los amplicones mediante gel de Agarosa y preparación para secuenciación.....	26
4.8 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en portaobjeto y en placa M96.....	26
4.9 Titulación de anticuerpo y conjugado.....	26
4.10 Alineamiento con MUSCLE.....	28
4.11 Análisis filogenético usando MEGAV7.....	28
• 5. RESULTADOS	29
5.1 Aislamientos virales en células C6/36.....	29

5.2 Amplificación genómica a partir de aislamientos de DENV.....	30
5.3 IFI en portaobjeto.....	33
5.4 IFI en placa.....	35
5.5 Caracterización mediante secuenciación y análisis filogenético.....	37
5.6 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	31
• 6. DISCUSIÓN.....	41
• 7. CONCLUSIONES	44
• 7. REFERENCIAS.....	45
• A. ANEXO.....	49
A.1 Protocolo 20: aislamiento viral (Dengue) em células de insecto C6/36 – ViroMol Laboratório de Virologia Molecular ICC/Fiocruz – Modificado y traducido.....	49
A.2 Volumes of Buffer AVL and carrier RNA-Buffer mix required for the QIAamp Viral RNA Mini procedure.....	50
A.3 Secuencias utilizadas para árboles filogenéticas.....	51
A.4 Secuencias de nucleótidos forward (G2-G8)...	53

ABREVIATURAS

4G2 – anticuerpo para epítipo conservado de la proteína E de flavivirus

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ADNc – Ácido Desoxirribonucleico complementario

A. aegypti – *Aedes aegypti*

A. albopictus – *Aedes albopictus*

ALEXA 488 – Marcador verde fluorescente con absorción a 488nm

AVL – Buffer comercial Quiagen®

ARN – Ácido Ribonucleico

ARNpol – Polimerasa de ácido Ribonucleico.A

ARN-AVE – Solución carrier del kit QIAamp

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

C6/36 – Línea celular de mosquito

CO₂ – Dióxido de Carbono

D1/D2 – Secuencias utilizadas como primers

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol, marcador fluorescente para núcleos

DENV1-4 – Dengue virus serotipo 1 a 4

dNTPs - deoxinucleótidos

DTT - Ditioneitol

ECP – Efecto citopático

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IFI – Inmunofluorescencia indirecta

IFN – Interferón

IgG – Inmunoglobulina de tipo G

JEV – Virus de la encefalitis japonesa

L15 – Medio de cultivo Leibowitz-15

MEGA – Molecular evolutionary genetics analysis

MgCl₂ – Cloruro de Magnesio

MPM – Marcador de pesos moleculares

MUSCLE - Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation

NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5 – proteína no estructural de DENV

OPS – Organización Panamericana de la Salud

PBS – Phosphate Buffer Solution

prM – proteína pre-M

RdRp – ARN polimerasa dependiente de ARN

RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

SFB – Suero fetal bovino

SybrSafe – Tinción para ADN

TAE – Buffer Tris, acetato y EDTA

WNV – Virus del Nilo Occidental

RESUMEN

El número de casos de enfermedades causadas por *flavivirus* en Latinoamérica presenta una progresión en constante ascenso hasta nuestros días. Tal es el caso del virus dengue (DENV) transmitido por *A. aegypti* y *A. albopictus*.

En nuestro país, luego de 1916 no se registraron casos de DENV autóctono hasta 2016, cuando aparece un nuevo brote de DENV.

En el presente trabajo, tomando como base 10 muestras de suero humano positivas para DENV pertenecientes al brote uruguayo de 2016, se plantea como objetivo el aislamiento viral, su identificación y caracterización filogenéticas. Infectando células C6/36, se obtuvieron stocks virales viables, que fueron monitoreados observando al microscopio la aparición de efecto citopático (ECP). Se confirmó la presencia de proteínas de origen viral en el interior celular mediante la puesta a punto de una inmunofluorescencia indirecta (IFI) en portaobjetivo y en placa. De ambos ensayos, las IFI en placa tuvo mejor calidad y arrojó mayor nivel de detalle. Además, se detectó material genético viral amplificando regiones discretas del genoma usando primers (D1 y D2) para la región prM mediante RT-PCR. La caracterización genética se llevó a cabo secuenciando, alineando y haciendo análisis filogenético de las muestras amplificadas. En este brote uruguayo estuvimos ante la presencia de DENV-1 de genotipo V con 3 introducciones independientes del virus al Uruguay. De las 10 muestras analizadas se obtuvo resultados satisfactorios para 9 de ellas.

INTRODUCCIÓN

Grupo Arbovirus

Se trata de virus que se mantienen en la naturaleza a través de la transmisión biológica entre hospederos vertebrados susceptibles y artrópodos hematófagos. La transmisión biológica puede ser horizontal o vertical. La transmisión vertical involucra el pasaje del virus de un vector infectado a la descendencia. Mientras que dentro de la transmisión horizontal la más común es de una hembra infectada a un hospedero vertebrado a través de la saliva durante la ingesta de sangre (Burgueño, A. 2016). Las familias más importantes a nivel médico y veterinario son *Nairoviridae*, *Phenuviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Togaviridae*. La tabla 1 muestra el estatus taxonómico de arbovirus.

Los síntomas de enfermedad causadas por arbovirus que afectan a humanos se clasifican en tres grupos: síndrome febril sistémico, meningitis y/o encefalitis y fiebre hemorrágica. La gravedad de la enfermedad dependerá de diversos factores como la edad y el estado inmunológico del paciente, la dosis del virus inoculado y la patogenicidad de la cepa viral. A su vez, la problemática de transmisión a humanos se ve incrementada por problemas demográficos y sociales como ser los medios de transporte modernos que proporcionan cambios en la ecología natural de los virus y aparición de virus en nuevas locaciones con vectores y huéspedes susceptibles (Gubler, DJ. 2001).

Familia	Número de géneros	Número de virus
<i>Nairoviridae</i>	3	17
<i>Phenuviridae</i>	1	10
<i>Flaviviridae</i>	1	53
<i>Reoviridae</i>	1	22
<i>Rhabdoviridae</i>	1	16
<i>Togaviridae</i>	1	31

Tabla 1. Estatus taxonómico de arbovirus conocidos. Construido a partir de ICTV

En los últimos 30 años se ha producido un resurgimiento de enfermedades transmitidas por arbovirus, mayormente debido a ciertos cambios a nivel demográfico y social (Tabla 2).

Factores responsables por la aparición/resurgimiento de enfermedades ocasionadas por arbovirus

Cambios demográficos

- Aumento de la población mundial
- Movimiento de poblaciones entre distintas regiones
- Urbanización sin control y sin planificación

Cambios sociales

- Invasión humana a los lugares donde hay focos de las enfermedades

Transporte de seres humanos, animales y materias primas dentro y entre regiones

Envíos utilizando contenedores

Cambios agrícolas

- Uso de la tierra
- Sistemas de riego
- Deforestación

Cambios en los patógenos

- Aumento en los movimientos de humanos y animales
- Cambios genéticos que llevan a un aumento en el potencial epidémico

Cambios en salud pública

- Falta de control efectivo de los mosquitos
- Deterioro de la infraestructura de salud pública para hacer frente a enfermedades transmitidas por vectores
- Monitoreo de las enfermedades
- Programas de prevención

Tabla 2. Lista de factores que incluyen en la emergencia y resurgimiento de enfermedades debidas a arbovirus. Extraído y modificado de Gubler et. al. 2001

Flavivirus

Taxonomía

El género *Flavivirus*, junto con *Hepacivirus*, *Pegivirus* y *Pestivirus* pertenecen a la familia de los *Flaviviridae* que pertenecen a su vez a dominio *Riboviria* (ICTV, Taxonomy). Contiene alrededor de 50 especies, en su mayoría relacionada a patógenos humanos-artrópodos como Dengue virus (DENV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus del Nilo occidental (WNV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV). La Fig 1 muestra las relaciones filogenéticas de los géneros para *Flaviviridae*

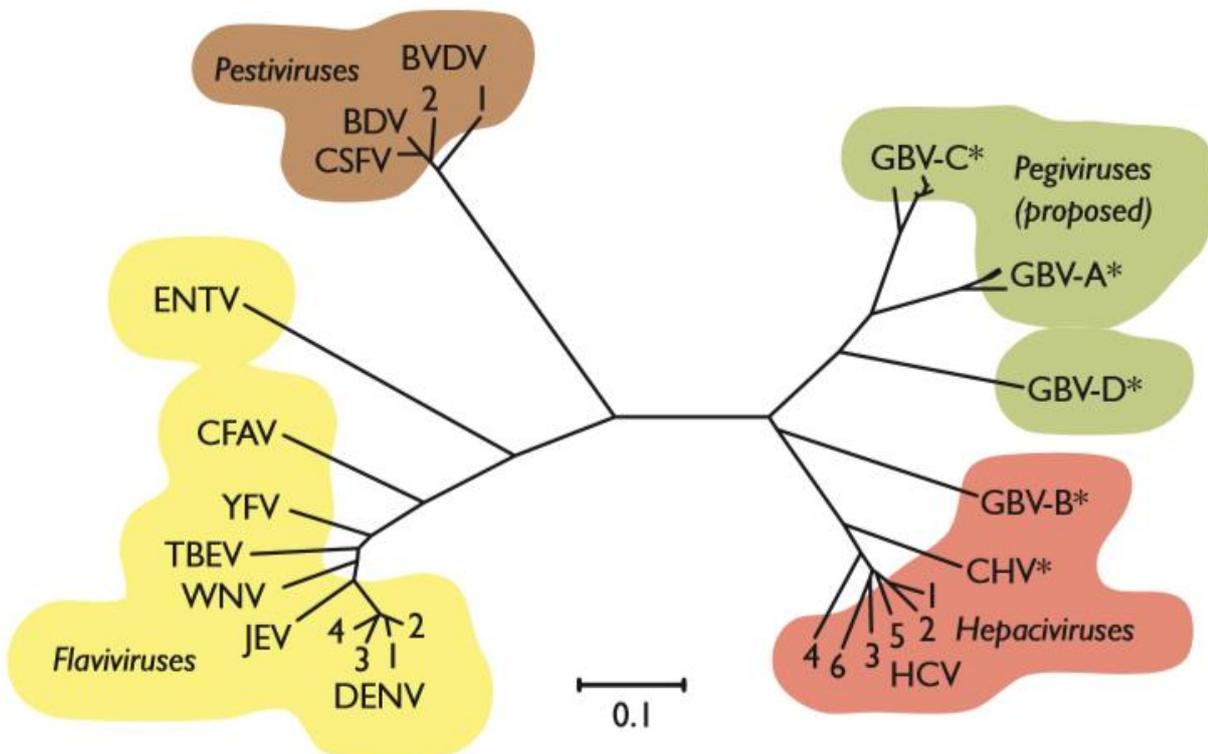


Figura 1. Árbol filogenético de ARN polimerasas dependientes de ARN mostrando miembros de *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*. Extraído de Fields 6^{ta} edición.

Dengue Virus

Orígenes de DENV

La teoría más aceptada es que el DENV surgió en África ya que la mayoría de los flavivirus asociados a enfermedades transmitidas por mosquitos, así como el mosquito vector *Aedes aegypti* habrían surgido en dicho continente (Gaunt et al 2001). También pudo haber tenido un origen asiático ya que distintos serotipos de DENV se encuentran presentes en Asia (Wang et al 2001). De hecho, manifestaciones clínicas similares a DENV se pudieron encontrar en dicho continente hacia el año 992 A.C. No fue hasta la epidemia de 1779-1780 que los casos fueron bien documentados (Gubler et al 1997). Recién luego de la Segunda Guerra Mundial, japoneses y estadounidenses pudieron aislar DENV (Hotta et al 1952, Sabin et al 1952). El movimiento de tropas, la destrucción del ecosistema y los asentamientos humanos, propiciaron la propagación de DENV por el Sudeste asiático y el Pacífico occidental (Rosen et al 1977). Mientras tanto, en las Américas el surgimiento de DENV epidémico se asocia con la propagación de sus mosquitos vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El primero registro de DENV data de 1635 en Martinica, Guadalupe y Panamá. En 1946 la OPS realizó campañas de erradicación del mosquito vector *Aedes aegypti* (Monath 1994) el cual también es vector para el virus de la fiebre amarilla. A pesar del éxito de dichas campañas, en las décadas de 1960 y 1970 se produjo la re-invasión del mosquito. Para 1981 se registró una epidemia en Cuba y un brote severo en Venezuela entre los años 1989-1990 (OPS 2014). Entre los años 2000-2010 hubo una dispersión del mosquito vector y de los casos de dengue. De hecho, solo en el periodo de 2001-2007 se detectados > 4 millones de casos.

Taxonomía

Dentro de DENV hay 4 serotipos distintos, epidemiológicamente similares, pero genéticamente distintos (Kurane y Ennis 1992) Fig 3. Éstos se definen según reacciones cruzadas de varias pruebas serológicas (Repik et al 1983). Con el advenimiento de los análisis de ácidos nucleicos, la clasificación se volvió más precisa incluso pudiendo distinguir varios genotipos dentro de cada serotipo de DENV (Rico-Hesse 1990).

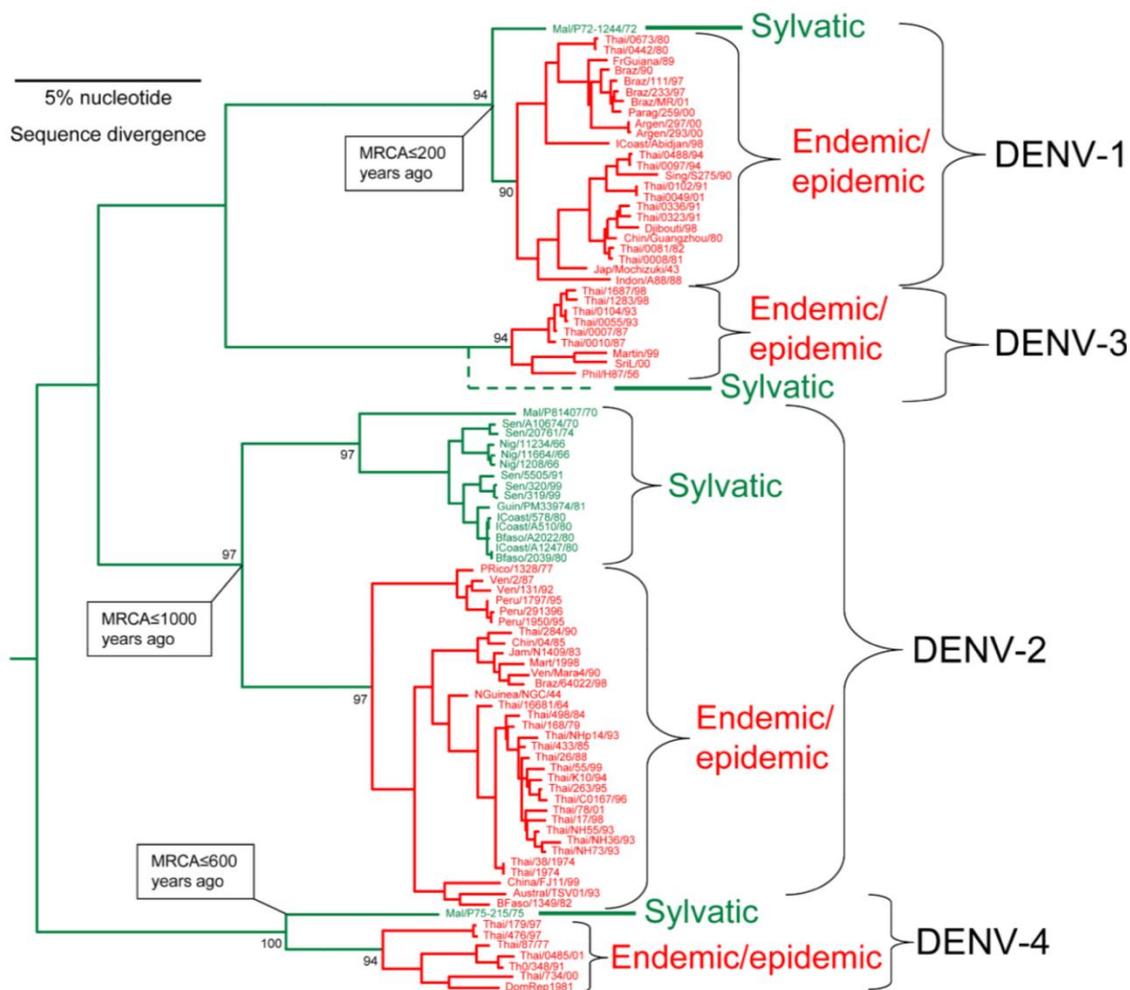


Fig 2. Árbol filogenético de los cuatro serotipos de DENV de secuencias completas extraídas de la biblioteca de GenBank. Extraído de Weaver, S.C. (2009)

En DENV-1 se identificaron cinco genotipos: genotipo I representando cepas del sudeste asiático, China y África oriental, genotipo II de cepas de Tailandia, genotipo III cepas selváticas recolectadas en Malasia, genotipo IV representando cepas del Pacífico occidental y Australia. Finalmente, genotipo V pertenecientes a cepas recolectadas en las Américas, África occidental y parte de Asia.

En tanto que DENV-2, también presenta cinco genotipos: genotipo asiático I, genotipo asiático II. Genotipo II o cosmopolita (incluye Australia, África oriental y occidental, las islas

del Pacífico e Índico, el subcontinente indio y el Medio Oriente. Genotipo III americano y el genotipo IV asiático/americano.

DENV-3 y DENV-4 presentan ambos 4 genotipos cada uno (Weaver 2009).

Estructura

Las partículas infecciosas de los flavivirus son aproximadamente esféricas, de unos 50nm de diámetro rodeadas por una envoltura lipídica. La parte externa del virión está compuesta por dos proteínas, la proteína de envoltura (E) y la proteína de membrana (M). La glicoproteína E es el principal determinante antigénico del virión y media la unión y fusión durante la entrada del virus. La proteína M es un pequeño fragmento proteolítico de la proteína precursora (prM) y se produce durante la maduración viral dentro de la vía secretora. La proteína C, es de la cápside y se la conoce como proteína core o de cubierta.

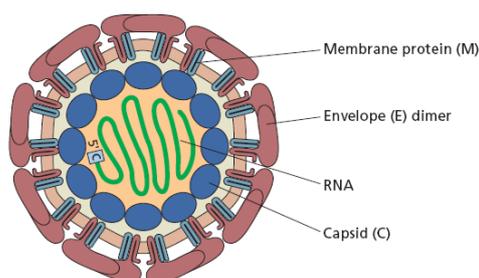


Figura 3. Representación de partícula viral de DENV. Se señalan las proteínas estructurales y el ARN. Extraído de Flint 4ta ed vol. 1 pag 501

Las partículas de flavivirus inmaduras adoptan varias apariencias a medida que salen de la vía secretora. Poco después de su formación, los viriones inmaduros son más grandes (60nm de diámetro) que los viriones maduros y muestran 60 espículas prominentes en su superficie. Se componen de tres heterodímeros E-prM, con la molécula prM cubriendo el péptido E de fusión. A medida que las partículas inmaduras pasan a través del entorno de bajo pH de la red trans-Golgi se produce una reorganización de las glicoproteínas. Los viriones inmaduros adoptan una apariencia casi indistinguible de las partículas maduras, con la excepción que la prM permanece unida. Este cambio conformacional es seguido de la escisión de la prM mediante la enzima de la célula huésped furina, revelando así los viriones maduros.

El genoma de DENV es ARN+ de aproximadamente 11kb. Contiene una región 5'UTR de unas 100b, un solo ORF codificante para una única poliproteína y un 3'UTR de unas 400b. La poliproteína codifica 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). De las proteínas estructurales, C integra la cápside, prM previene la fusión prematura del virus y E cumple funciones en la unión y la fusión viral. En tanto, de las proteínas no estructurales, NS1 está involucrada en la replicación, NS2A tiene funciones de resistencia a interferón (IFN), NS2B sirve como cofactor de proteasas, NS3 funciona como proteasa, helicasa y trifosfatasa de ARN, NS4A funciona como resistencia a IFN, inductor de alteraciones de membrana de la célula huésped y serviría como anclaje para el complejo de replicación, NS4B también cumple funciones en

la resistencia a IFN y finalmente la NS5 es la RdRp que tiene en su extremo N-terminal un dominio metiltransferasa importante para la formación de la estructura cap (Bartenschlager et al, 2008)

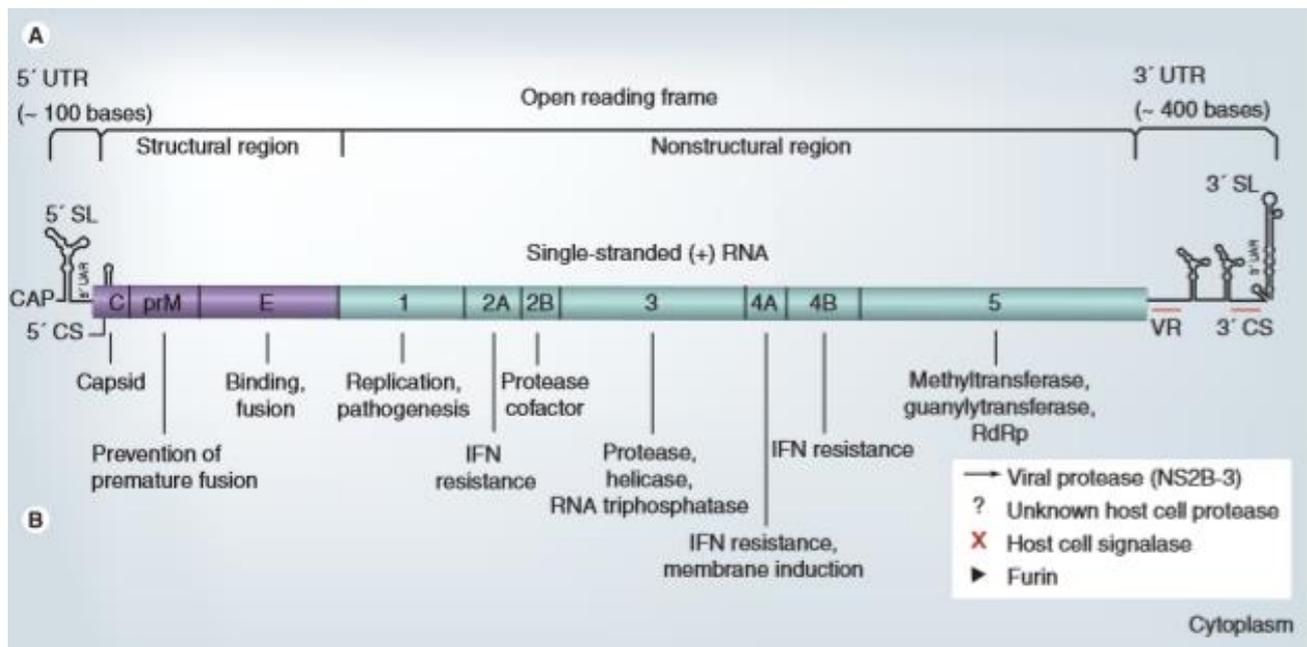


Figura 4. Esquema del genoma de DENV mostrando las regiones codificantes para la poliproteína. Extraído de Bartenschlager et al, 2008

Ciclo de replicación

El ciclo de replicación comienza con la entrada a la célula huésped (células dendríticas, linfocitos T y B, monocitos, hepatocitos y células neuronales) mediado por la proteína E (Plat, JB. 1997). Luego se produce una endocitosis mediada por receptor. El genoma viral es liberado al citoplasma, siendo en el retículo endoplasmático donde se traduce la poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos. Dicha poliproteína sufre procesamiento co y post-traduccional (proceso mediado por proteínas no estructurales y proteínas celulares). Para la replicación del material genético viral se forma el complejo proteico NS5 con actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), proteínas NS accesorias, ARN viral y probablemente factores de la célula huésped. A todo esto, se lo denomina complejo de replicación. Se sintetiza entonces, ARN de polaridad negativa (ARN-), formándose un intermediario ARN+/ARN- que sirve como molde para más ARN+. La replicación es asimétrica y semiconservativa (Bartenschlager et al, 2008)

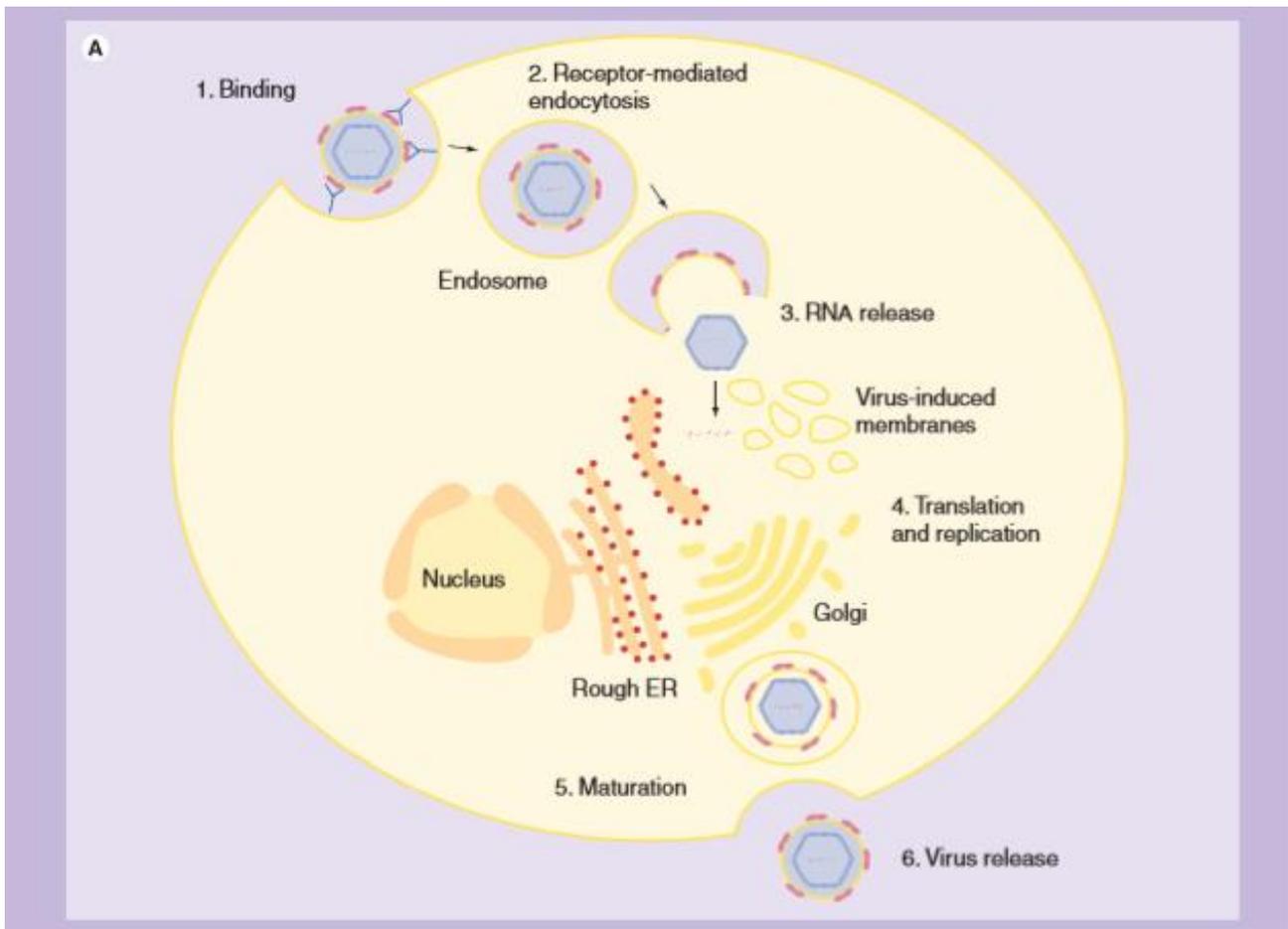


Figura 5. Esquema del ciclo replicación de DENV extraído de Bartenschlager et al, 2008

Respuesta inmunológica a DENV

Respuesta inmune innata

El DENV se transmite a través de la picadura de un mosquito vector infectado. La infección subsiguiente comienza en las células de la piel como queratinocitos, y células de Langerhans. Esto hará que se despliegue una serie de respuestas inmunológicas a través de células del sistema inmune innato como las células dendríticas (DC, *dendritic cells* del inglés), macrófagos y monocitos. Dichas células usan PRR (del inglés *pattern recognition receptors*) para desencadenar las respuestas inmunes como es la producción de citoquinas y quemoquinas. Los PRR que se utilizan son: RIG-1 (del inglés *retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (del inglés *melanoma differentiation-associated protein 5*), TLR3 y TLR7 (del inglés *toll-like receptors 3 y 7*).

Uno de los tipos de respuesta a la infección por DENV es la producción de interferón (IFN). Una de las vías utilizadas puede ser a través de RIG-1 y MDA5 que se las llama RLR (del inglés *RIG-1-like receptors*) y se encuentran en el citoplasma de ciertos tipos de células de sistemas como el mieloide, epitelial y nervioso. Estas reconocen ARN fosfatado y de doble cadena. Al reconocer estos patrones (los ligandos exactos en el ARN de DENV son desconocidos al momento), las RLRs se traslocan a la mitocondria generando la activación

de MAVS (del inglés *mitochondrial antiviral signaling*). Esto lleva a la activación de TBK1 (del inglés *TANK-binding kinase 1*), IKKε (del inglés *IκB kinase-ε*, IRF3 e IRF7 (del inglés *IFN regulatory factors 3 y 7*) que entran al núcleo e inducen la producción de IFNs como IFNβ.

Otra vía en la respuesta a INF puede ser a través de la interacción con los TLRs. TLR3 reconoce en endosomas dsRNA (del inglés *double-strand RNA*), mientras que TLR7 reconoce ssRNA (del inglés *single-strand RNA*). La activación de TLR3 causa la fosforilación de TRIF (del inglés *TIR-domain-containing-adaptor-inducing IFNβ*), interacciona con TRAF3 (del inglés *TNF-receptor-associated-factor 3*) y con TBK/IKKε para inducir ISGs (del inglés *IFNα/β stimulating genes*) y la producción de quemoquinas. Es decir que TLR3 actúa sinérgicamente con RIG-1 y MDA5 para producir un estado antiviral.

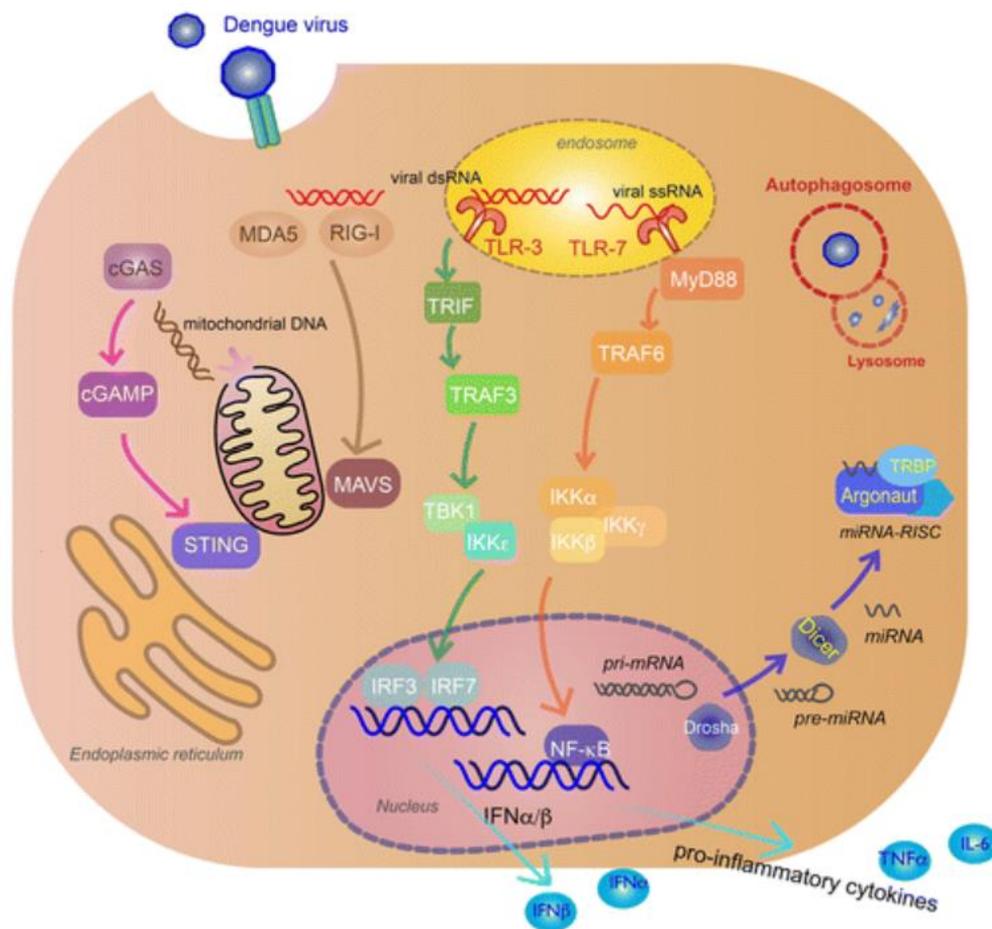


Figura 6. Respuesta inmune innata a la infección con DENV. Esquema representando los diversos mecanismos de inmunidad innata con la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

inflamatorias. Cita de la figura Uno et al 2018

TLR7 reconoce tanto ssRNA como fragmentos genómicos de DENV. Para ello usa la vía del MyD88 (en inglés *myeloid differentiation primary response gene 88*) induciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, reclutando a TRAF6 (del inglés *TNF-receptor-associated-factor 6*) para activar IKKα/IKKβ/IKKγ y NF-κB (del inglés *nuclear factor-κB*).

Además, el daño en las mitocondrias causado por DENV promueve la liberación de ADN mitocondrial, lo cual conduce a la inducción de las vías de cGAS (del inglés *cyclic GMP-AMP synthase*) y STING (del inglés *stimulator of IFN gene*). Ambas vías llevan a las activaciones de TBK1 e IRF3 que desencadenarán la producción de IFNs de tipo 1.

Otra respuesta del sistema inmune innato frente a la infección por DENV, es la producción de micro ARN interferentes. Los miRNA (del inglés *micro RNA*) se unen a la proteína RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*) en el citoplasma para degradar ARN viral. La biogénesis de miRNA comienza en el núcleo como pri-miARN, que al ser procesados por Drosha (enzima con actividad ribonucleasa), se transforma en pre-miRNA. En el citoplasma ésta es procesada por Dicer (otra enzima con actividad ribonucleasa) produciendo miRNA maduros (Uno, N. et al. 2018).

Inmunidad adaptativa en DENV

En la piel, las células de Langerhans, dendríticas, mastocitos, macrófagos y monocitos son los primeros en encontrarse con el virus. Los mastocitos se degranulan en minutos liberando citoquinas (como IFN α y TNF), quemoquinas (como CCL5, CXCL10 y CXCL12) y proteasas. La producción de quemoquinas facilita el reclutamiento de otros tipos de células del sistema inmune como linfocitos T CD8⁺, NK (del inglés *natural killers*) y NKT (del inglés *natural killers T*) que eliminan DENV y producen una limpieza viral. En tanto que los moDCs (del inglés *monocyte-derived dendritic cells*) sirven para amplificar la respuesta viral y como células presentadoras de antígenos de células T CD8⁺ y T CD4⁺, en la zona T de los nódulos linfáticos a donde migran. Esto inicia la respuesta inmune adaptativa. Las células T CD4⁺ activadas tienen la capacidad de convertirse en células T_{FH} (del inglés *T follicular helper*), migrando de la zona T en los nódulos linfáticos a la periferia de la zona B germinal participando en el desarrollo de células B de memoria específicas para DENV. Los linfocitos T_{FH} pueden migrar a nuevos nódulos linfáticos generando más células T y B de memoria, así como también quedar circulando en la sangre.

En una segunda infección con DENV, los linfocitos T_{FH} entran a los centros germinales de los nódulos linfáticos induciendo expansión clonal de linfocitos B específicos productores de anticuerpos para DENV. Los linfocitos T CD4⁺ adquieren un fenotipo citotóxico y contribuyen a la eliminación de DENV (St. John, AL. 2019).

Epidemiología de DENV

El DENV es el arbovirus más importante en el mundo en lo que respecta a la población que vive en zonas de riesgo (2,5 billones) y a la cantidad de casos reportados (100 millones de casos al año) (Racolz, V. 2012). Existen cuatro serotipos distintos con una similitud entre muy limitada (entre un 60-75%) en lo que se refiere a aminoácidos. A su vez, dentro de un serotipo hay una semejanza cercana al 97% de sus aminoácidos y un 94% a nivel nucleotídico, dividiéndolos en genotipos o clados (Lambrechts, L. 2012., Vu TT, 2010., Cologna R, 2005., Ohainle M, 2011).

Los primeros casos reportados de Dengue se remontan incluso a los años 1779-1780, incluso mucho tiempo antes (Cleaves, GR. 1989). En la región de las Américas, el Dengue sigue siendo un problema. Los síntomas más severos se dan cuando un humano entra en contacto con distintos serotipos del virus. En las Américas, todos los serotipos de Dengue han podido ser aislados (Chomczynski, P. 2006).

Las características típicas de la fiebre por Dengue son: fiebre alta, escalofríos, dolores musculares, rash cutáneo, entre otros. A su vez, en función de la severidad, la enfermedad por virus dengue se puede clasificar en: dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave. (Tabla 3).

Dengue sin signos de alarma	Dengue con signos de alarma	Dengue grave
Vive en áreas endémicas de dengue o viajó a ellas. Fiebre y 2 o más manifestaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Dolor abdominal intenso y continuo • Vómito persistente • Acumulación de líquidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Escape importante de plasma que lleva a: choque o acumulación de fluidos en el pulmón y disnea
<ul style="list-style-type: none"> • Náuseas, vómitos • Exantemas • Mialgias y artralgias • Petequias o test de torniquete positivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangrado de mucosas • Letargia, irritabilidad • Hepatomegalia > 2cm • Aumento del hematocrito con caída rápida de plaquetas 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangrado grave • Daño orgánico grave
<ul style="list-style-type: none"> • Leucopenia 		

Tabla 3. Clasificación de dengue según la Organización Mundial de la Salud. Extraído de "Estudio de la circulación de Arbovirus en el Uruguay"

Transmisión

El principal artrópodo transmisor del virus dengue son las hembras del *Aedes aegypti*. Los brotes de dengue también se han atribuido a *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y algunas especies del complejo *Aedes scutellaris*. Cada una de las especies tienen ecología, conducta y distribución geográficas determinadas. Las hembras se alimentan principalmente 2 horas antes del amanecer y 2 horas después del atardecer. Si un mosquito infectado pica a un humano, la incubación del virus es entre 8 a 12 días. El individuo infectado puede presentar síntomas después de 5 a 7 días (Chomczynski, P. 2006). La dinámica de la transmisión depende de varios factores, siendo los más importantes las interacciones entre humanos, mosquitos y factores ambientales (Stoddard, ST. et al. 2013).

DENV en las Américas

Fue durante la década de 1960-1970 que en el continente americano se llevó a cabo una campaña de erradicación del mosquito vector *Aedes aegypti*, no por DENV sino contra la fiebre amarilla. A pesar del beneficio de la campaña, la misma no se sostuvo en el tiempo, produciéndose la reintroducción del vector, provocando brotes en la década de 1970-1980 de DENV-2 y DENV-3 en algunos países de América Latina y el Caribe. Desde ese entonces la región ha sufrido de las mayores incidencias de casos a nivel mundial (68% de todos los casos a nivel mundial entre los años 2000-2006), con brotes cada 3 a 5 años. Como ejemplo, la tasa de infecciones era de 771 cada 100.000 habitantes para dicho periodo, aumentando en relación con el periodo 1990-1999.

Económicamente los costos para los países de la región se estimaron en 2.1 mil millones de dólares por año. El control de la enfermedad se enfoca respecto a: el desarrollo de una vacuna y campaña de erradicación del vector. El primero, aún está en desarrollo y el segundo sigue siendo costoso y poco eficiente (Cafferata, ML et al 2013).

En Argentina DENV es epidémico restringiéndose a los meses de noviembre a mayo y relacionándose con brotes en países vecinos. Básicamente, se han registrado casos pertenecientes a los serotipos 1, 2 y 3, pero no se han notificado casos autóctonos del serotipo 4 (MSA. 2009). Brasil en tanto, es responsable del 60% de los casos en América (Teixeira, MG., et al. 2008), siendo el serotipo 3 el predominante, mientras que en menor medida circulan los serotipos 1 y 2 (Lindoso, JA. 2009). A continuación, un resumen de hechos y observaciones ocurridos en el continente americano se muestra a continuación en la Tabla 4

Año	Hechos y observaciones
1977	Pandemia de DENV 1
1977-1978	Último aislamiento de DENV 3 hasta 1994
1981	Primera epidemia de DHF/DSS (Cuba)
1985	Introducción de mosquitos de <i>aedes albopictus</i>
1989	Segunda epidemia de DHF/DSS (Venezuela)
1994	Reintroducción de DENV 3 (Nicaragua y Panamá)
2000	Expansión del mosquito <i>aedes aegypti</i> , hiperendemicidad con co-circulación de múltiples serotipos, endemicidad de DHF

Tabla 4.. "Main dengue related events occurring in the American region during the last 30 years of the 20th century." Extraído de Guzman MG et. al. 2003

La Figura 7 muestra la evolución entre 1990 y 2014 de los serotipos de Dengue en las Américas (OPS. 2015).

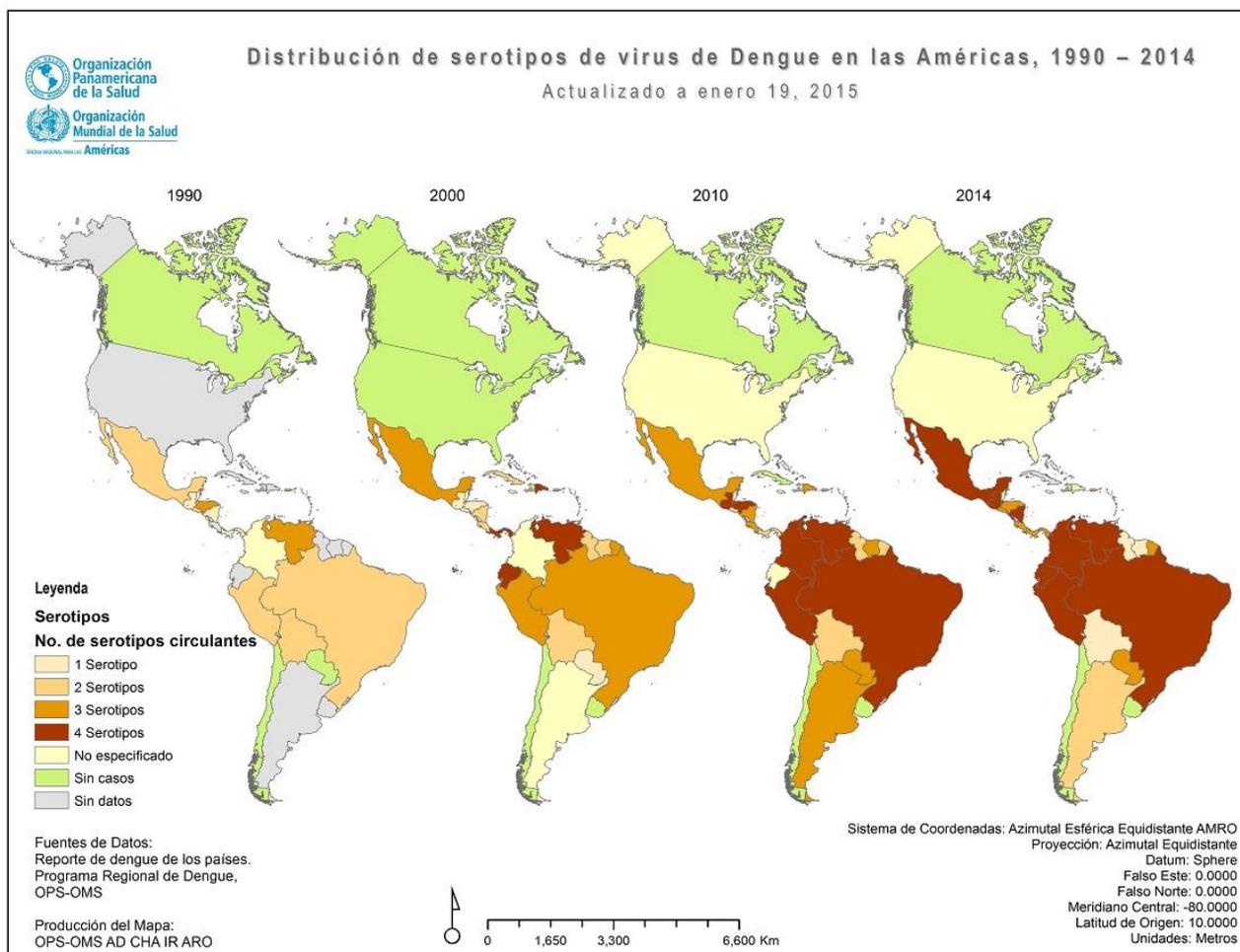


Figura 7. Distribución de serotipos de virus Dengue en las Américas entre 1990 y 2014 extraído de: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/1990-2014-cha-serotipos-mapa-dengue-americas.jpg>

“En la 46 Asamblea Mundial de la Salud (AMS) del 14 de mayo de 1993 se aprobó la resolución 46.31 acerca de la prevención y el control del Dengue (UN. 1990), la cual insta a los países miembros a:

- Fortalecer programas para la prevención del dengue y la vigilancia de las poblaciones de vectores y casos en humanos.
- Concentrarse en medidas efectivas para reducir la densidad de vectores y transmisión de la enfermedad.
- Incrementar la capacidad de diagnóstico, así como fortalecer la vigilancia clínica y epidemiológica.
- Enfatizar un desarrollo urbano planificado que ofrezca suministros de agua seguros y confiables.
- Incrementar el personal entrenado y reducir la mortalidad de los casos mediante un mejor manejo clínico de los mismos.
- Fortalecer la investigación sobre la fisiopatología de las infecciones de dengue.
- Mejorar la educación comunitaria en materia de salud, promover prácticas de higiene en incrementar la conciencia y capacidad de acción de la comunidad.
- Facilitar las pruebas de campo Fase III para vacunas contra el dengue.”

Situación de DENV en Uruguay

En 1997 se detectó la reintroducción del vector en nuestro país. A partir de ese momento el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) ha centralizado la vigilancia en el ámbito público y privado. Hasta febrero de 2016 el promedio de casos sospechosos era de 120 por año, con un diagnóstico de 6 casos por año de DENV importado.

A comienzos de 2016 se vieron incrementados los casos de DENV provenientes principalmente de Paraguay. En febrero, luego de más de 100 años, se registró el primer caso de DENV autóctono en Uruguay (barrio Pocitos). Fue en esta situación que el gobierno del Uruguay decidió reforzar la vigilancia y las campañas para eliminar criaderos de mosquitos y realizar fumigaciones que tuvieran como principal objetivo eliminar los adultos de *Aedes aegypti* (OPS. 2010). Luego de este primer caso el Ministerio de Salud Pública confirmó en total 19 casos autóctonos (todos DENV-1) y 36 casos importados (22 DENV-1, 3 DENV-4, 1 DENV-2 y 1 DENV-3) (Burgueño et al 2016).

Diagnóstico de DENV

Fases de la enfermedad

La enfermedad se divide en 3 fases. La primera fase, o fase febril, se caracteriza por una fiebre aguda y repentina (dura entre 2 a 7 días), rash cutáneo, dolores corporales generalizados, mialgias, dolores retro-ocular, entre otros. La segunda fase, o fase crítica, comienza al descender la fiebre a unos 37,5°C o menos, entre los primeros 3 a 7 días, pudiendo presentar permeabilidad capilar, hemorragias graves que pueden llegar a comprometer órganos. Finalmente, llega la fase crítica, luego de 2 a 3 días y si el paciente sobrevive, los síntomas generales comienzan a mejorar (Chomczynski, P. 2006).

Los parámetros usados como recurso diagnóstico son: prueba del torniquete, hipotensión, trombocitopenia, presión de pulso y presión media. La prueba del torniquete consiste en inflar el manguito de un tensiómetro hasta una presión entre la sistólica y la diastólica durante 5 minutos. La prueba se considera positiva cuando se observan más de 3 petequias por cm². La hipotensión sistólica para niños menores de 5 años tiene que ser menor a 80mmHg, mientras que para mayores a 5 años tiene que ser menor a 90mmHg. La trombocitopenia se considera baja cuando se observa un promedio de 2-3 plaquetas/campo. La presión de pulso, calculada como la diferencia entre la sistólica y la diastólica debe ser mayor a 30mmHg.

Métodos de diagnóstico, aislamiento viral, extracción de ARN e IFI en DENV

El diagnóstico de DENV es de gran importancia para un posterior manejo del cuadro clínico. Puede depender tanto del momento de la recolección de la muestra y del propósito del ensayo, pudiéndose detectar componentes del virus o del huésped (anticuerpos) (WHO/TDR. 2009).

Existen varias opciones a la hora de aislar DENV viable, en el presente trabajo se emplean células C6/36 de *Aedes albopictus* (Anderson, R. 2003). El aislamiento en C6/36 se presenta como la técnica de referencia que permite un estudio posterior del virus (Bartenschlager R. 2008).

Una vez aislado DENV, se puede confirmar su presencia ya sea por IFI, (Bartenschlager R. 2008) o mediante RT-PCR. Éste último ensayo proporciona un diagnóstico rápido, sensible, simple y reproducible para los distintos serotipos presentes (Igarashi, A. 1978). Para la realización del ensayo de RT-PCR se necesita extraer el material genético viral. Se puede extraer de suero, plasma, sangre, tejidos y saliva (Patel P. 2013). El primer método desarrollado para la extracción del ácido nucleico viral usó la mezcla cloroformo/fenol/tiocianato de guanidinio, por el que el ADN es separado del ARN, permaneciendo este último en la porción acuosa superior (Gubler, DJ. 1984).

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue el aislamiento, identificación y caracterización filogenética de cepas de DENV autóctono e importado del brote 2016 de Uruguay

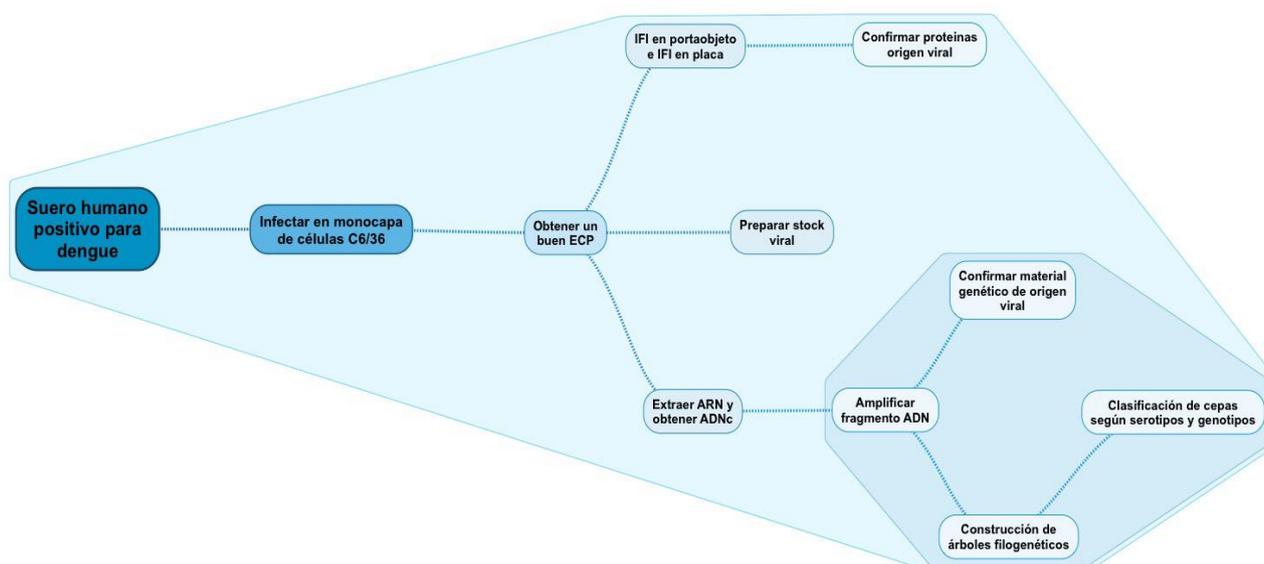
Objetivos específicos

- a. Aislamiento viral en cultivos de células C6/36 a partir de sueros provenientes de pacientes humanos.
- b. Puesta a punto de ensayos de inmunofluorescencia indirecta en portaobjeto y en placa para la identificación viral en cultivos celulares.
- c. Detección de genoma viral a partir de los aislamientos utilizando RT-PCR y oligonucleótidos específicos para DENV
- d. Caracterización genética de los aislamientos obtenidos mediante secuenciación y análisis filogenético.

ESTRATEGIA DE TRABAJO

Dada la importancia de DENV a nivel mundial y a nivel país, esta enfermedad transmitida por mosquito se posiciona como una de las que alcanza mayor número de casos por año. En 2016, hubo un aumento de casos autóctonos e importados en Uruguay, que produjo una alarma a nivel sanitario. Bajo estas circunstancias, resultó relevante poder caracterizar las cepas de DENV del brote 2016, así como también, generar stock de virus viable autóctonos para el banco de virus de la Facultad de Ciencias.

La estrategia consistió en infectar células de mosquito C6/36 para obtener virus viable con sueros de pacientes diagnosticados con DENV. Mediante RT-PCR de un fragmento de la poliproteína (fragmento de C-prM) se confirmó la presencia de material genético viral. Se puso a punto la técnica de IFI en portaobjeto y en placa utilizando un anticuerpo monoclonal capaz de reaccionar con la proteína E, de origen viral, la cual se encuentra localizada en el espacio intracelular. Mediante secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos por RT PCR y posterior análisis filogenético se caracterizaron las cepas del brote 2016 de DENV según serotipo y genotipo.



MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de células C6/36 para infección con sueros humanos

Con el objetivo de inocular sueros humanos de casos de DENV, se crecieron células C6/36 en medio Leibowitz-15 (L-15) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% v/v de glutamina, 1% v/v de gentamicina y 1% v/v de triptosa. Se realizó incubación a 37°C sin intercambio de CO₂. Cada 24 a 48 horas se controló replicación celular, renovando el medio de cultivo. Una vez la monocapa alcanza un 70-80% de confluencia se procedió a inocular con los sueros humanos.

Preparación de los sueros e inoculación en monocapa

Se utilizó como referencia el "Protocolo 20: aislamiento viral (Dengue) em células de inseto C6/36 – ViroMol Laboratório de Virologia Molecular ICC/Fiocruz" (*Anexo A-1*).

Se preparó monocapa con 24 horas de crecimiento. Se retiró el medio de cultivo L-15 al 10%, lavándolo con un volumen de 5mL de L-15 sin SFB.

La muestra de suero humano se filtró con membrana de 0,22µm en una dilución 1:10 utilizando L-15 al 5% de SFB. Se realizó además un control negativo de infección usando L-15 sin SFB. Se realizaron controles de la infección cada 15 minutos al microscopio durante 1 hora. Si la monocapa de células comenzaba a desprenderse durante el período de incubación de 1 hora, se retiraba el inóculo y se agregaban 2mL de L15 al 5% de SFB centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm sin refrigeración. El sobrenadante se re-inoculó en la monocapa y se agregó 5mL de L15 al 5% de SFB dejando incubar por 7 días). Se agregó 5mL de L15 al 5% de SFB y se dejó incubando por 7 días, con observación diaria de aparición de efecto citopático (ECP). Cada 48 horas del inicio de la infección se renovaban 2mL de L15 al 5%.

Preparación de stock de virus

Al final de cada infección, y/o ante la observación de ECP (tanto para el primer pasaje como los subsiguientes), la monocapa se deprendió con ayuda de un raspador mecánico, conservando las mezcla de células y sobrenadante en criotubos a -80°C. La confirmación de material viral dentro de las C6/36 se realizó por detección de ARN viral a través de RT-PCR y por inmunofluorescencia indirecta.

Segundo pasaje

Luego de 7 días de infección y/o ante la aparición de un buen ECP se procedió a cosechar las infecciones mediante raspado mecánico. Se dispensó 50µL de las infecciones en 450µL de L15 al 5% en una monocapa nueva con 24 horas de crecimiento. Se agregó 4,5mL de L15 al 5% de SFB. En algunos casos donde no se observó ECP, al día 7 se realizó un pasaje ciego.

Extracción de ARN mediante Kit QIAamp y Trizol

Se separó parte de la monocapa infectada para extracción de ARN total bajo cámara de flujo. Se realizaron dos protocolos de extracción: QIAamp y Trizol

En el kit QIAamp se preparó una mezcla de buffer AVL y carrier ARN-AVE según *tabla A-2 (Anexo)*. Se dispensaron 540µL del buffer preparado a un eppendorf y se agregaron 140µL de sobrenadante de cultivo celular, mezclando con vórtex por 15s. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugando 15s a 1500rpm para quitar gotas de la tapa. Se agregaron 560µL de Etanol (96-100%) a la muestra y su respectivo blanco, se mezcló usando vórtex por 15s. Se dispensó la solución anterior a una columna QIAamp mini con un tubo colector, centrifugando 1 minuto a 8000rpm. Se colocó la columna QIAamp mini en un nuevo tubo colector, descartando el tubo que contiene el filtrado. Se repitió este último paso hasta consumir todo el volumen de muestra. Se colocaron 500µL de buffer AW1 en la columna, centrifugando 1 minuto a 8000rpm. Se colocó la columna QIAamp mini en un tubo colector nuevo descartando el tubo que contiene el filtrado. Se colocó en la columna QIAamp mini 500µL de buffer AW2, Se centrifugando a máxima velocidad (13.500rpm en vez de 14.000rpm del kit), colocando la columna QIAamp mini en un tubo colector nuevo y descartando el tubo que contiene el filtrado. Se agregaron 60µL de buffer AVE, incubando a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugando por 1 minuto a 8000rpm.

Para la técnica de Trizol, se recolectó el cultivo celular infectado, lavándolo con Buffer de Fosfato Salino (PBS). Se agregaron 500uL de Trizol, y se resuspendió mediante pipeteo y vórtex dejándolo 5 minutos en reposo a temperatura ambiente. Se agregaron 100uL de cloroformo usando vórtex por 15s y dejando reposar 3 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 14.000rpm a 4°C, transfiriendo la fase acuosa a un nuevo tubo y agregando 500uL de isopropanol. Se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugando por 10 minutos a 14.000rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con 500uL de Etanol 75%, centrifugando durante 2 minutos a 14.000rpm a 4°C. Se descartó el Etanol 75%, secando ligeramente en estufa a 37°C durante 10 minutos. Se resuspendió en 30uL de agua estéril libre de ARNasas.

Retrotranscripción y Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Una vez obtenido el ARN total se realizó la RT-PCR de acuerdo con Lanciotti et al (1992), los primers son: D1 (TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-) y D2

(TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC). El producto final es un ADN doble hebra de 511pb, correspondiente a la región codificante para las proteínas C y prM.

Para la retrotranscripción, se mezclaron 5uL de ARN, 4uL del oligonucleótido D2 (10mM), 1uL de dNTPs (10mM) y 4uL agua estéril. Se incubó a 68°C durante 5 minutos seguido de incubación a 4°C. Se agregó a la mezcla anterior, 4uL de 5x First Stand Buffer, 1uL de DTT (0,1M), 0,1 µL Superscript II de Invitrogen (200u/uL). El ciclo de calentamiento fue de 60 minutos a 48°C seguido de 15 minutos a 70°C.

Para la reacción en cadena de la polimerasa, se agregaron 5uL de ADNc, 5uL de Buffer 10x, 1,5uL de MgCl₂ (50mM), 1uL de dNTPs (10mM), 5uL de D1 (10uM), 5uL de D2 (10uM), 27,2uL de Agua estéril, 0,3uL de Taq ADNpol Platinum (5u/uL). El ciclado constó de 35 ciclos de amplificación dividido en tres etapas, 30s a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto 72°C.

Análisis de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa y preparación para secuenciación

La electroforesis se realizó en gel de agarosa 1,5% en buffer TAE 1X, y 2uL de Bromuro de Etidio o 5uL de ADN SybrSafe a fin de visualizar los amplicones bajo luz UV. Se dejó gelificar durante 15-20 minutos, cargando la mezcla de 2uL de Buffer de carga y 5uL de muestra. Se realizó la electroforesis a 100V durante 20-30 minutos, agregando para cada gel un marcador de pesos moleculares (MPM), según el tamaño esperado del amplicón. En este caso se utilizó un marcador de pesos moleculares (MPM) de 1kb.

Los amplicones se secuenciaron automáticamente en la empresa MacroGen[®] (Corea del Sur) con los mismos oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en portaobjeto y en placa de M96

Para la inmunofluorescencia en portaobjeto, se raspó mecánicamente las células infectadas, agregando 1mL de PBS 1X y se centrifugó durante 5 minutos a 1500rpm. Se quitó el sobrenadante, lavando las células con 500uL de PBS 1X y resuspendiendo el pellet en 100uL de PBS. Se colocaron 10-15uL de la suspensión en cada hoyo de una lámina portaobjeto, dejándolo secar 50-60 minutos. Se fijó con acetona 100% durante 5 minutos y se dejó secar entre 30-40 minutos.

Titulación de anticuerpo y conjugado

Una vez que se preparó el portaobjeto, se prepararon diluciones seriadas del anticuerpo monoclonal 4G2 (anticuerpo que reacciona con un epítipo conservado de la proteína E de *flavivirus*) (1:100, 1:200, 1:400, 1:600 y 1:800) con un control negativo de PBS 1X. Se prepararon por duplicado usando 20uL de cada dilución y el control negativo, incubando por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Se lavó con PBS 1X tres veces, dejando secar (no por completo). Se goteó 20uL de anti-IgG de ratón- ALEXA 488 de Invitrogen (conjugado

que emite fluorescencia verde, con absorción a 495nm) de dos diluciones (1:800 y 1:1000), incubando por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Se sumergió en el colorante de contraste azul de Evans (1:30.000) por 5 minutos, Finalmente se lavó con PBS 1X tres veces y se realizó el montaje de las laminillas cubreobjeto con una gota por cada pocillo de Glicerol/PBS (90%/10%).

Para la IFI en placa, se prepararon placas de M96 conteniendo $2,5 \times 10^6$ células por pocillo. Luego de 24 horas, se infectaron con DENV, dejando adsorber por 1 hora a 27°C. Se adicionó 200µL/pocillo de L15 al 5%, incubando durante 48 horas. Se retiró el medio de cultivo y las células infectadas se fijaron con metanol – acetona 50% v/v durante 20 minutos a -20°C. Se realizaron las diluciones del anticuerpo 4G2 (1:200, 1:400 y 1:600), colocando 50uL por pocillo de cada dilución (*ver figura 10*) e incubando a 37°C durante 1 hora. Se dosificó 50uL por pocillo de anti-IgG de ratón-ALEXA 488 y DAPI (1:5000) por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C, quitando luego el ALEXA+DAPI y lavando con PBS 1X tres veces.

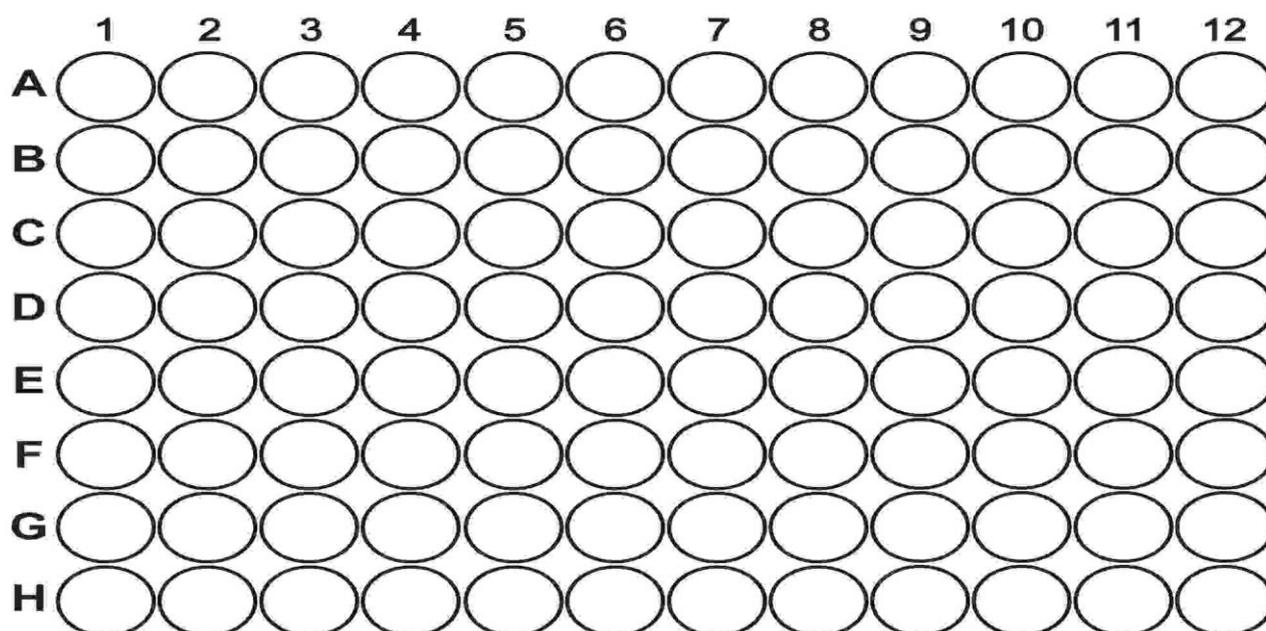


Figura 8. Esquema de trabajo para placa de 96 pocillos. En el trabajo, las filas de E hasta la H no fueron utilizadas. Selección A1:B6 – Desde A1 hasta A6 el pasaje es sin dilución, ALEXA 1:400 y duplicados de dilución de anticuerpo (1:200, 1:400 y 1:600). Desde B1 hasta B6 el pasaje es sin dilución, ALEXA 1:800 y duplicados de dilución de anticuerpo (idem A1:A6) Selección C1:D6 – Desde C1 hasta C6 el pasaje está diluido 1:20, ALEXA 1:400 y duplicados de dilución del anticuerpo (idem A1:A6). Desde D1 hasta D6 el pasaje es diluido 1:20, ALEXA 1:800 y duplicados de dilución de anticuerpo (odem A1:A6). Selección A7:B12 – Desde A7 has A12 es el control sin infección, ALEXA 1:400 y duplicados de dilución de anticuerpo (idem A1:A6). Desde B7 hasta B12 es control sin infección, ALEXA 1:800 y duplicados de dilución del anticuerpo (idem A1:A6). Selección C7:D12 – Desde C7 hasta C12 es control sin infección, ALEXA 1:400 y duplicados de dilución de anticuerpo (idem A1:A6). Desde D7 hsata D12 es control sin infección, ALEXA 1:800 y duplicados de dilución de anticuerpo (idem A1:A6). Para el caso de 2D y 7B, no se pudo obtener una foto por lo tanto se incluyen en color gris

Alineamiento de secuencias con MUSCLE

Se utilizaron aproximadamente 100 secuencias pertenecientes a los cuatro serotipos de DENV (las secuencias pertenecientes a los sueros humanos del brote uruguayo G1-G9 inclusive). Con dichas secuencias se realizaron dos alineamientos. El primer grupo más extenso en cantidad de secuencias y pertenecientes a los cuatro serotipos y el segundo grupo con secuencias solo de DENV-1 y sus distintos genotipos.

La herramienta usada fue MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Análisis filogenético usando MEGA7

Para las porciones de genoma amplificadas, se construyeron dos árboles filogenéticos por máxima verosimilitud (ML).

El modelo de sustitución de nucleótidos TN93+G (Tamura-Nei con distribución gamma discreta) se usó para construir el árbol que ubica las muestras de genoma amplificado como DENV-1 y K2P+G+I (Kimura de 2 parámetros con distribución gamma discreta y con sitios invariables evolutivamente) para el árbol que ubica los amplicones en genotipo V.

RESULTADOS

Aislamiento viral en células C6/36

Según Singh, K.R.P et al (1969) y Paul, F.J et al (1969), las características del ECP en cultivo celular de C6/36 es la lisis de células, el desarrollo de grandes masas sincitiales (“fusion from within”), gradual incremento en células multinucleadas y la fagocitosis de células muertas. Cabe aclarar que la formación de sincitios no se debe a la ocurrencia de fusión a nivel de la membrana plasmática, sino que se debe a rearrreglos de las membranas intracelulares (retículo y Golgi) ocasionados por la replicación viral (Barth & Schatzmayr, 1992)

Para preparar el stock de virus, se cosechó la infección ante la visualización de ECP (sincitios) partiendo de una placa con crecimiento confluyente de C6/36 (*figura 9C*). Pasados 7 días se levantó la monocapa y se realizó en todos los casos un segundo pasaje, que se observó como máximo una semana y se cosechó ante la aparición de ECP (*figura 9A*). Esta evaluación visual se realizó para las infecciones de cada muestra de suero humano. A partir de las infecciones que mostraron el ECP descrito se prepararon los stocks de virus.

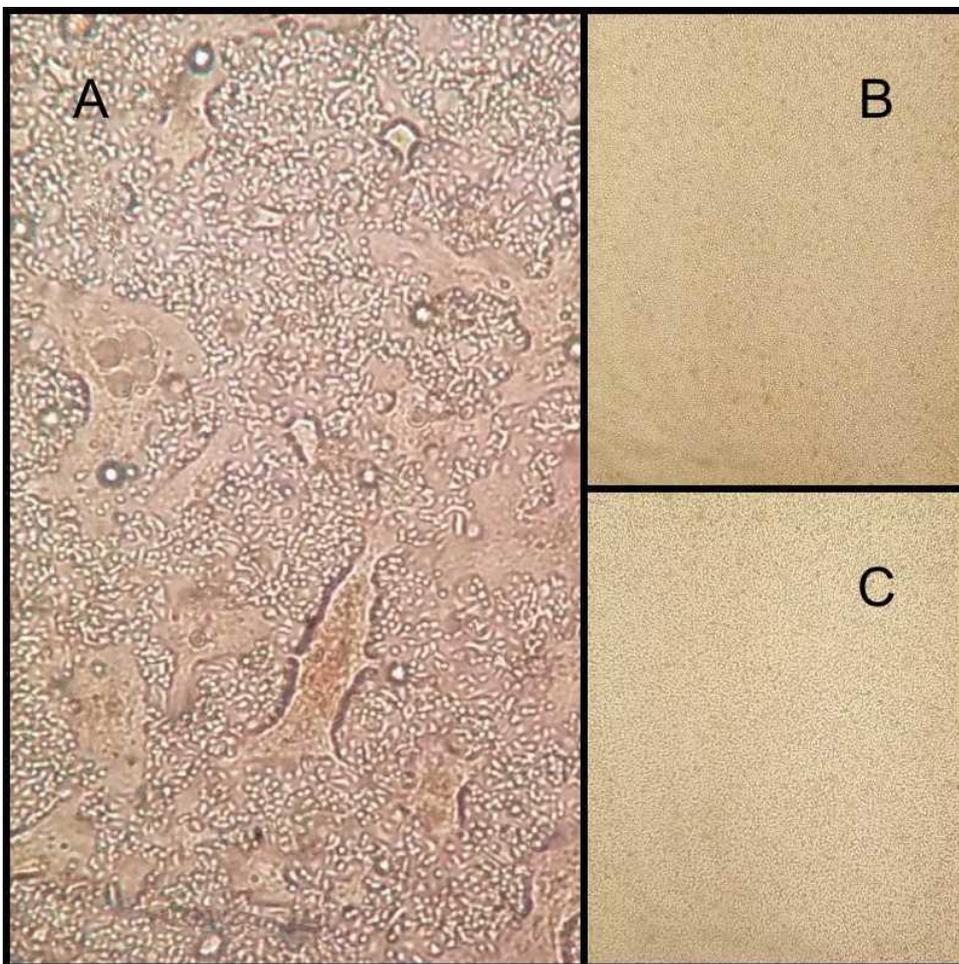


Figura 9. Imágenes al microscopio óptico del transcurso de una infección con DENV de la muestra 4725181 en células C6/36 donde se muestra A, segundo pasaje con un marcado ECP, B control sin infección y C: infección transcurridos 7 días y previo a segundo pasaje sin ECP.

DetECCIÓN DE GENOMA VIRAL A PARTIR DE AISLAMIENTOS UTILIZANDO PRIMERS ESPECÍFICOS PARA DENV

Amplificación genómica a partir de aislamientos de DENV

A cada una de las 10 muestras de suero humano se les aplicó el protocolo de aislamiento viral, seguido de extracción de ARN total y posterior RT-PCR. El resultado de RT-PCR corresponde a un amplicón de 511pb, porción del genoma de DENV correspondiente a la región de la proteína C-prM. Se confirmó la amplificación en 9 de 10 muestras.

El éxito de la amplificación genómica se evaluó con geles de agarosa. En todos los casos se usaron marcadores de peso molecular, controles sin infección (una placa que no se inoculó con suero humano ni alícuota de pasaje ciego, según corresponda) y blanco de PCR.

Durante el transcurso del análisis de las muestras, se pudo observar distintas situaciones en lo que respecta a presencia ECP y presencia de banda característica del amplicón: ECP +/banda +, ECP +/banda -, ECP -/banda +, ECP -/banda -.

Se obtuvo resultados como en la *figura 5 superior*, donde ambas muestras mostraron una clara banda, la cual no estuvo presente en los controles negativos. En ambos casos los ECP fueron marcados. Se obtuvo resultados donde no se observó una banda y sin embargo el ECP fue notorio (*figura 10 inferior*). Nótese en este último caso la inclusión de un control positivo de infección. Esta muestra fue elegida por su marcada banda observada en los geles.

Caso como la muestra 4730691 que en el gel no presentó banda característica (*figura 10 inferior*), se decidió descongelar el stock y volver a infectar una monocapa de C6/36. De hecho, se realizó en dos oportunidades más (como se muestran en las fechas 01/08/17 y 31/08/17 de la *figura 11 superior*) hasta obtener una banda característica del amplicón.

Para la muestra 4728861 la ausencia de ECP llevó a realizar un nuevo pasaje con ese suero. Tanto para el primer pasaje, como para el segundo, se realizó la amplificación genómica. En ambos casos se observó banda en gel de agarosa característica (*figura 11 inferior*).

La muestra 4729901, en ninguna de las oportunidades dio positivo para la banda específica para dengue. Así se puede ver en la *figura 12* donde no se observa la banda característica para dengue.

Número muestra	Número MSP	Código Secuencia	Procedencia muestra	Aislamiento (ECP)	Amplificación	Secuenciación
4729181	1602058402	G1	Importado Py	+	+	+
4721171	1601217996	G2	Importado Py	+	+	+
4730691	1602238962	G3	Autóctono Uy	+	+	+
4728861	1602198774	G4	Autóctono Uy	+	+	+
4718431	1602108415	G5	Autóctono Uy	+	+	+
4729711	1602228864	G6	Autóctono Uy	+	+	+
4789801	1602228872	G7	Importado Br	+	+	+
4725311	1601127721	G8	Importado Py	+	+	+
4730121	1602228904	G9	Autóctono Uy	+	+	+
4729901	1602228884	-	Autóctono Uy	+	-	-

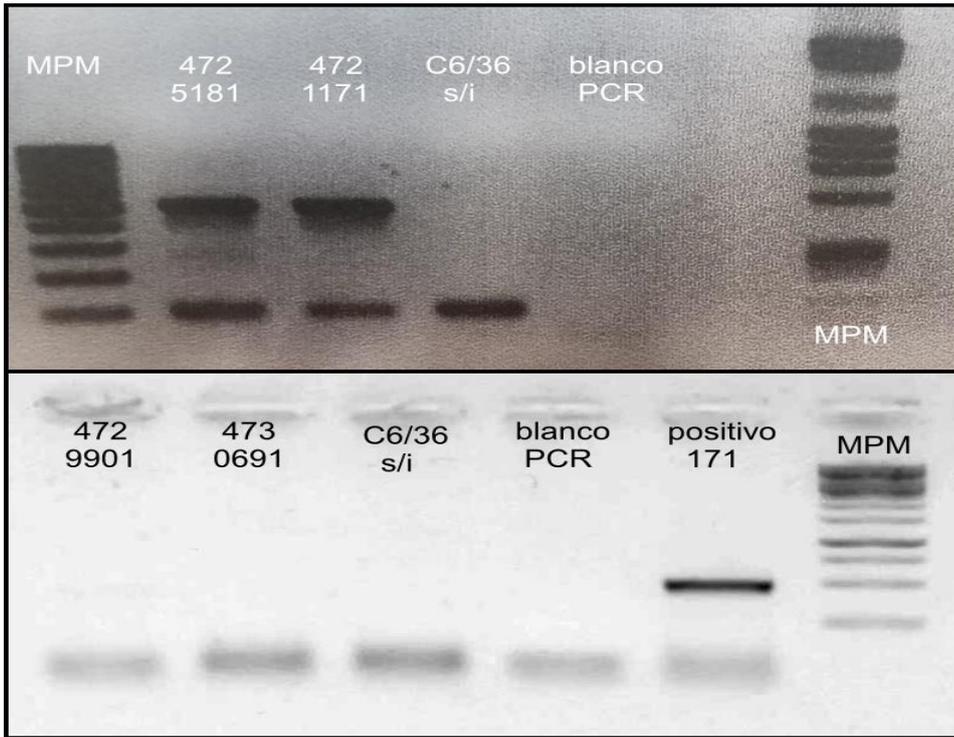


Figura 10. Geles en agarosa al 1,5% con SybrSafe. Superior: segundo pasaje de dos muestras. MPM- Marcador de Peso Molecular 1kb, 4725181 y 4721171 - muestras, C6/36 s/i - control sin infección en células de mosquito C6/36, blanco PCR. Inferior: segundo pasaje de dos muestras. 4729901 y 4730691-muestras, C6/36 s/i - control sin infección en células de mosquito, blanco PCR, positivo 171 y MPM.

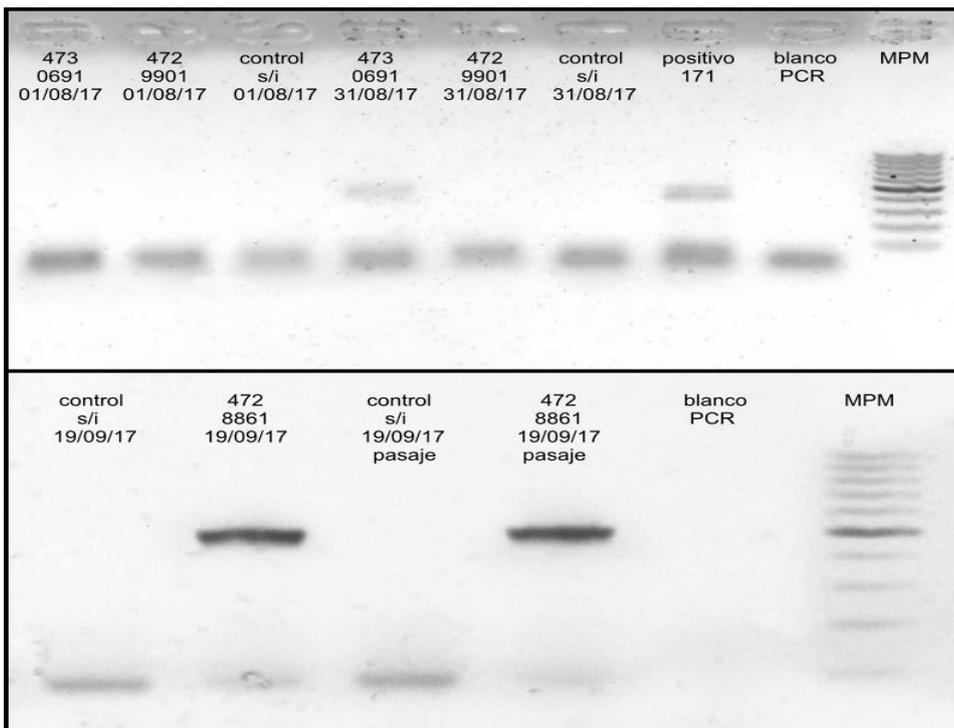


Figura 11. Geles en agarosa al 1,5% teñido con SybrSafe. En la parte superior dos sets de muestras del 01/08/17 y del 31/08/17 con sus respectivos controles correspondientes a un primer pasaje y a un segundo pasaje. En la imagen inferior otro aislamiento con un primer y un segundo pasaje.

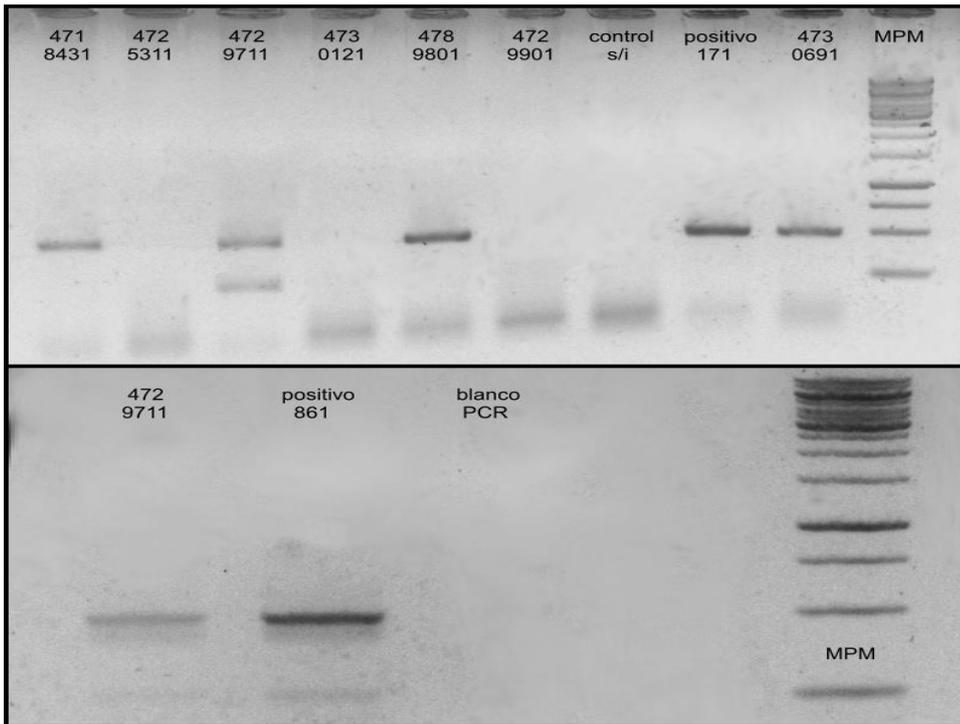


Figura 12. Geles en agarosa al 1,5% teñido con SybrSafe. En la parte superior se encuentra el gel de 7 muestras, un control negativo sin infección, un control positivo y MPM de 1kb. En la parte inferior la muestra 4729711 se purifica y se corre en gel de Agarosa al 1,5% nuevamente.

Puesta a punto de ensayos de inmunofluorescencia indirecta

IFI en portaobjeto

Para la detección de proteínas de origen viral (proteína E), se optimizó la técnica de IFI en portaobjeto. Se titularon el anticuerpo -4G2 y el conjugado anti-IgG de ratón-ALEXA 488, determinando las concentraciones óptimas de ambos. La observación de la fluorescencia de inmunofluorescencia.

Primero, se dejó fija la concentración del conjugado anti-IgG de ratón-ALEXA 488 en 1:800, variando las concentraciones del anticuerpo 4G2. En la *figura 13A*, se muestra el control negativo sin anticuerpo 4G2. En la *figura 13B*, el agregado de 4G2 es de 1:200 llegando a una dilución de 1:800 en la *figura 13E*.

Segundo, como se muestra en la *figura 14* se decidió variar la concentración de anticuerpo 4G2 manteniendo la concentración de conjugado anti-IgG de ratón-ALEXA 488 en 1:1000. Para 4G2, se usaron las mismas diluciones. Con ambos resultados se concluyó que las concentraciones óptimas son: 4G2 1:400 y conjugado 1:800. Se procesaron las 10 muestras de aislamientos virales de dengue con los resultados que se muestran en la *tabla 4*.

Además, en la *figura 15* se muestra el aislamiento viral correspondiente al suero 4729711, observándose la coloración verde manzana característica. La coloración roja de las células no infectadas corresponde a la tinción con azul de Evans, el cual fue usado como colorante de contraste.

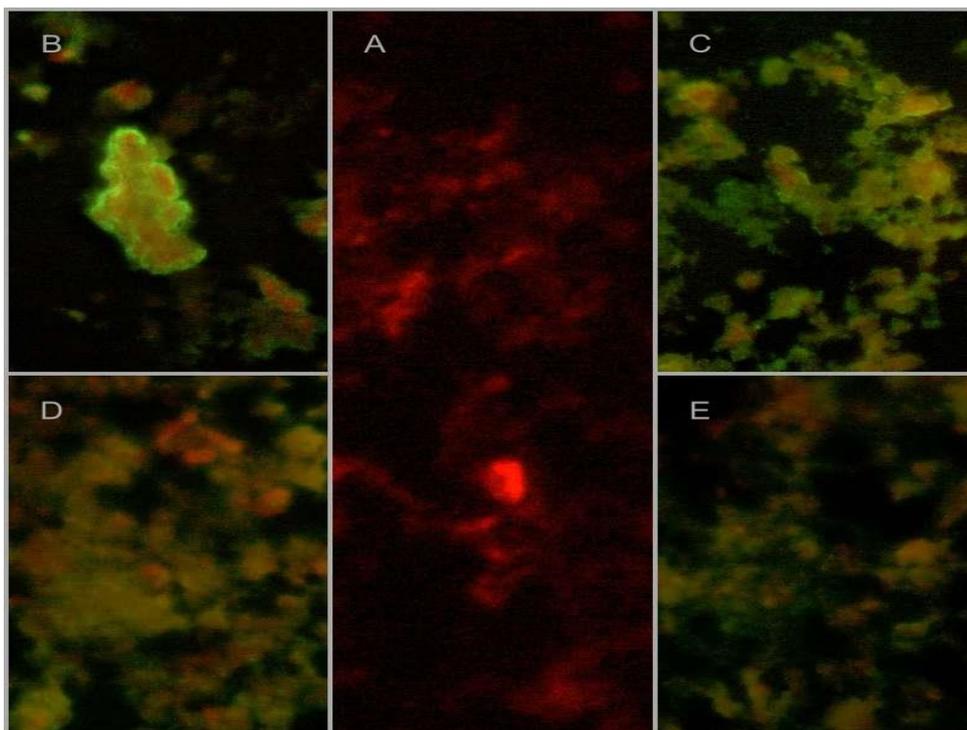


Figura 13. Titulación de anticuerpo -4G2 manteniendo fija la concentración de conjugado anti-IgG de ratón-ALEXA 488 a 1:800. A: no se agrega 4G2, se adiciona PBS 1X, B: anti-4G2 1:200, C: anti-4G2 1:400, D: 4G2 1:600, E: 4G2 1:800. Las células se fijaron utilizando Acetona 70% en cámara de Koplín.

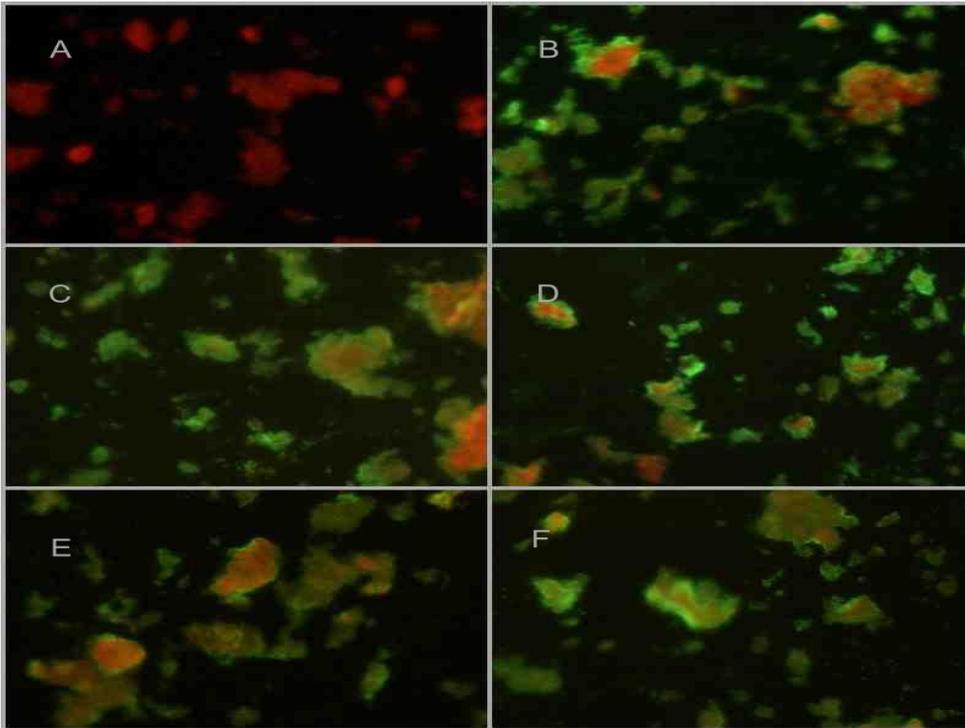


Figura 14. Titulación de anticuerpo 4G2 manteniendo fija la concentración de conjugado anti IgG de ratón-ALEXA 488 a 1:1000. A: no se agrega anti-4G2, se adiciona PBS 1X, B: 4G2 1:100, C: 4G2 1:200, D: 4G2 1:400, E: 4G2 1:600 y F: 4G2 1:800 Las células se fijaron utilizando Acetona 70% en cámara de Koplín.

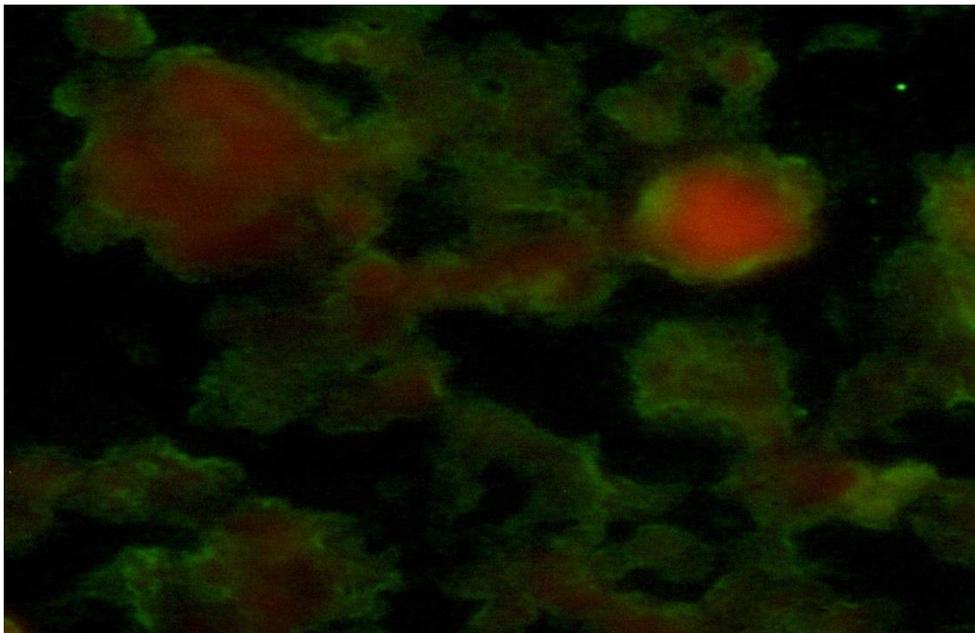


Figura 15. Células C6/36 infectadas con DENV provenientes de la muestra 4729711. -4G2 en concentración de 1:400 y conjugado anti-IgG de ratón-ALEXA 488 de 1:800. Coloración roja debida a Azul de Evans y coloración verde correspondiente a proteínas de origen viral.

IFI en placa

Se prepararon muestras sin diluir y con dilución 1:20 (en medio de cultivo) a partir del stock viral y se realizaron las infecciones en placa de 96 pocillos (M96), de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Obtenido un buen ECP, se fijaron las células con metanol- acetona (50%-50%) y se titularon el anticuerpo 4G2 y el conjugado anti IgG de ratón – ALEXA 488.

Esta técnica fue más beneficiosa porque: la fijación celular, la reacción antígeno-anticuerpo y anticuerpo-antianticuerpo se realizó en la propia placa. Las células conservaron bien su morfología y no se observó coloración de “fondo”. Por lo tanto, la calidad de las imágenes fue muy superior. En el control negativo (*figura 16 inferior*), las células no se muestran con fluorescencia verde, por lo cual se interpreta que éste no presenta tinción inespecífica. En la *figura 16 superior* se observó tinción positiva en las células infectadas, correspondiente a la proteína de origen viral. Además, la tinción con DAPI muestra claramente los núcleos teñidos, observándose fluorescencia azul.

La *figura 12* muestra la titulación para distintas concentraciones de conjugado anti-IgG de ratón-ALEXA 488 y anti-4G2 (según el esquema de *figura 17*).

En tanto que en la *figura 18*, se observa la titulación de anticuerpos con los controles negativos. Los archivos de las imágenes 2D y 7A resultaron dañados por lo que no se muestran.

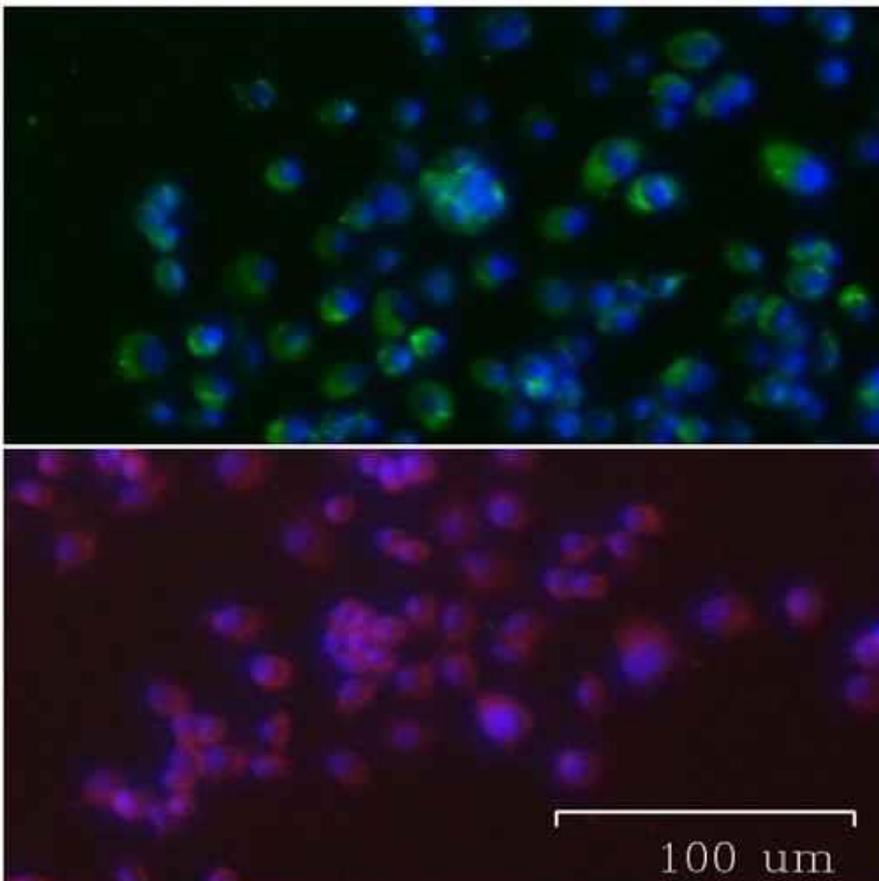


Figura 16. Resultado de IFI en placa. En azul se corresponde a DAPI para tinción de núcleos, en verde corresponde a ALEXA y en rojo a azul de evans para tinción de células. En B se observa un negativo de infección mientras que en A se observa el resultado de infección con DENV.

Positivos para infección

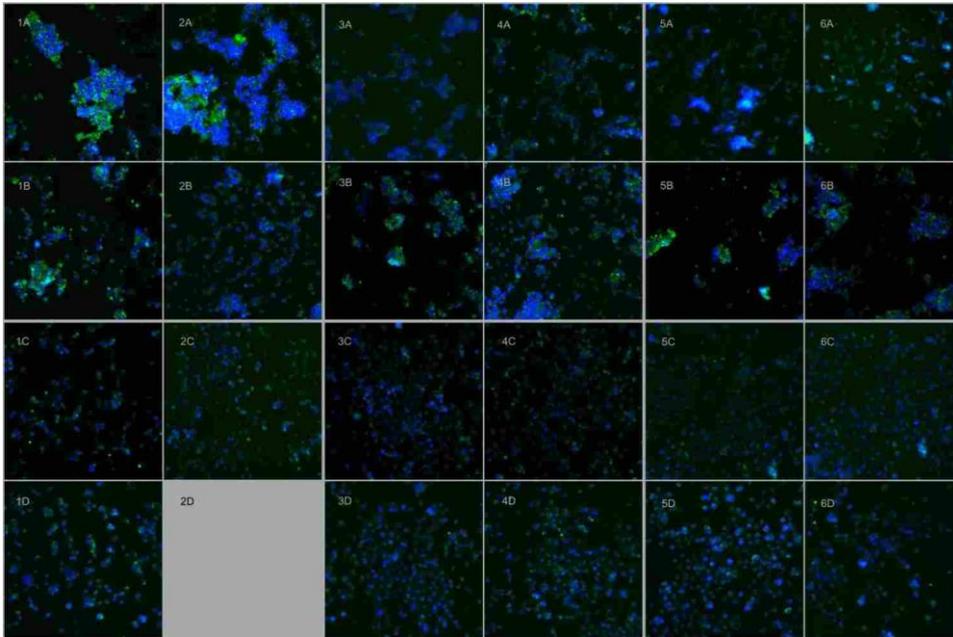


Figura 17. Esquema de inmunofluorescencia en placa, positivos para infección (referirse a figura 10). Aquí se muestra la titulación de 4G2 y ALEXA con el suero 4721171. A medida que disminuye ambas concentraciones la fluorescencia disminuye también. En todas las imágenes se observa presencia de material viral en el espacio intracelular. El archivo de la imagen codificada como 2D se dañó, por lo que se muestra como gris,

Controles negativos

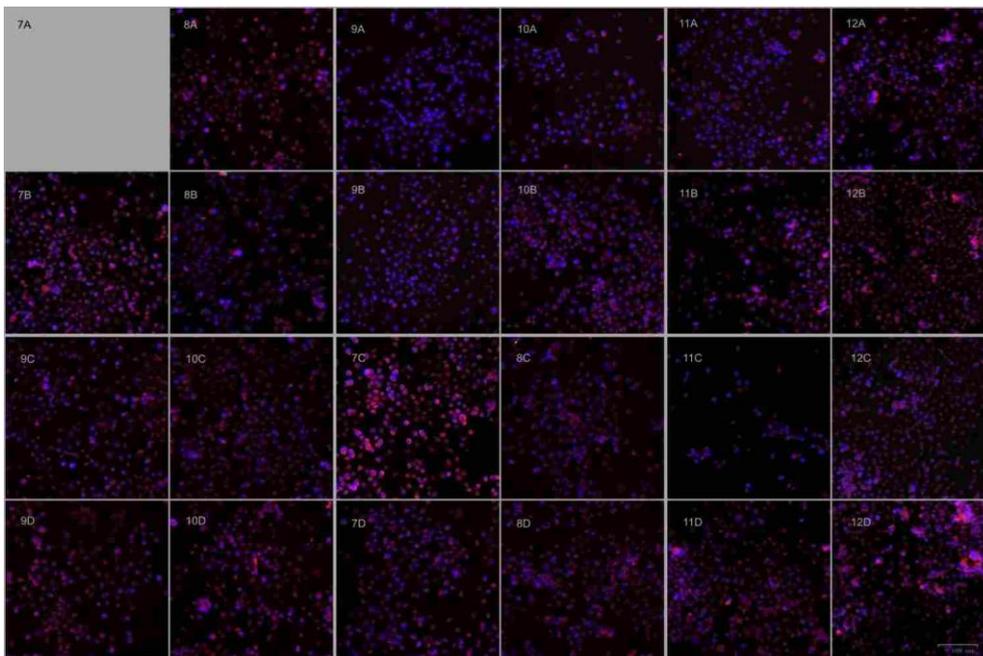


Figura 18. Esquema de inmunofluorescencia en placa, controles negativos. Aquí se observa ausencia de fluorescencia debida a ALEXA en todas las imágenes. El esquema de titulación es el mismo que para los positivos de infección. Se pierde muestra en la imagen codificada como 7A, viéndose como gris en el esquema.

Caracterización mediante secuenciación y análisis filogenéticos

A modo de ejemplo, se presenta el resultado de la secuenciación y el BLAST de la secuencia G7. El resto se encuentran presentados en la tabla anexa A-4.

Los fragmentos de ADN obtenidos se enviaron a secuenciar a Macrogen®, Corea. El resultado de la *figura 19* corresponde a la secuencia forward 5'-3' de la muestra G7. Se utilizó el software Bioedit para editar y corregir las secuencias observando los cromatogramas. Con la herramienta online BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), se comparó G7, obteniendo el resultado de la *figura 20* con secuencias de la base de datos y asignando un valor de significancia estadística. El porcentaje de identidad es de un 100% y no hay "indels".

Mediante búsqueda en NCBI, se descargaron 89 secuencias completas para DENV. Las mismas pertenecen tanto a DENV1-4, así como también a los distintos genotipos de DENV-1. Se realizaron dos árboles filogenéticos distintos para poder ubicar a los virus aislados dentro de serotipos y genotipos de DENV.

En la *figura 21*, las distancias genéticas para los cuatro serotipos de DENV fueron: 0,25 de DENV-1, 0,45 DENV-3, 0,58 DENV-2 y 0,87 DEN-4. Las nueve secuencias (G1-G9) se ubicaron dentro de DENV-1. Según Guzmán, et al 2014 y Holmes, et al 2006, los cuatro serotipos de DENV son genéticamente diversos y comparten una identidad limitada (divergencia aproximada del 30%). También hay variación aproximada del 6% dentro del mismo serotipo (entre genotipos de un mismo serotipo). La construcción del árbol se hizo con el método de máxima verosimilitud (en inglés *ML-maximum likelihood*), con un bootstrap de 1000. Los nodos relevantes se consideraron >90%. Los resultados dieron 93% el nodo de DENV-1/DENV-3, un alto nivel estadístico.

En la *figura 22*, las secuencias uruguayas G2,3,4,7,8,9 se ubican dentro de genotipo V (nodo con un bootstrap del 60%) y próximas a cepas de Ecuador y Colombia de 2013. Las secuencias G1y G6, también pertenecen a genotipo V. Sin embargo, están más relacionadas con cepas provenientes de Argentina y Brasil de 2009 y 2010. Finalmente, G5, también pertenece a genotipo V pero más similares a cepas más modernas de Argentina y Brasil (2010, 2012 y 2013).

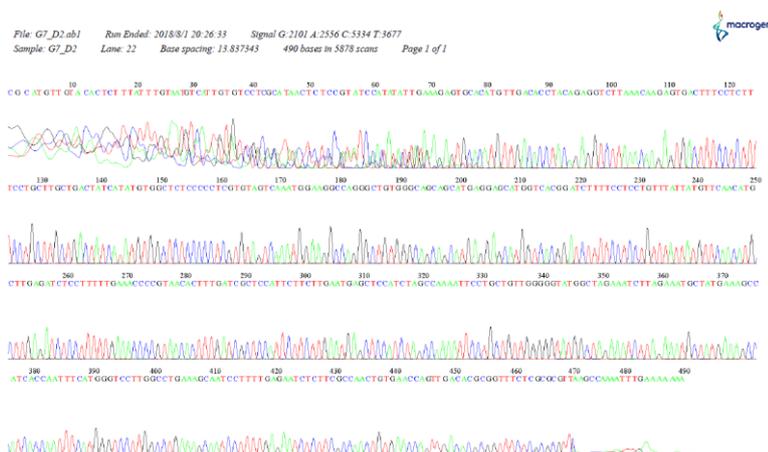


Figura 19. Secuenciación génica forward del suero humano codificado como G7. En la primera porción, no se distingue con claridad los nucleótidos, así como también en la región final. Dichas porciones de material genético son eliminadas para realizar el BLAST posterior.

Dengue virus 1 isolate M22 polyprotein (POLY) gene, partial cds
 Sequence ID: [MH349380.1](#) Length: 2325 Number of Matches: 1

Range 1: 54 to 524 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
870 bits(471)	0.0	471/471(100%)	0/471(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAAGGATTGCT			60
Sbjct 54	CGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAAGGATTGCT			113
Query 61	TTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTGGTGATGGCTTTCATAGCATTCTAAGATTTCTAGC			120
Sbjct 114	TTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTGGTGATGGCTTTCATAGCATTCTAAGATTTCTAGC			173
Query 121	CATACCCCAACAGCAGGAATTTGGCTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAAATGGAGCGAT			180
Sbjct 174	CATACCCCAACAGCAGGAATTTGGCTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAAATGGAGCGAT			233
Query 181	CAAAGTGTACCGGGTTTCAAAAAGGAGATCTCAAGCATGTTGAACATAATAAACAGGAG			240
Sbjct 234	CAAAGTGTACCGGGTTTCAAAAAGGAGATCTCAAGCATGTTGAACATAATAAACAGGAG			293
Query 241	GAAAAGATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCCTTCCATTTGAC			300
Sbjct 294	GAAAAGATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCCTTCCATTTGAC			353
Query 301	TACACGAGGGGGAGAGCCACATATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTCTT			360
Sbjct 354	TACACGAGGGGGAGAGCCACATATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTCTT			413
Query 361	GTTTAAGACCTCTGTAGGTGTCAACATGTGCACTCTCATCGCTATGGATTTGGGAGAGTT			420
Sbjct 414	GTTTAAGACCTCTGTAGGTGTCAACATGTGCACTCTCATCGCTATGGATTTGGGAGAGTT			473
Query 421	ATGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCGGATCACTGAGGCGGAACC			471
Sbjct 474	ATGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCGGATCACTGAGGCGGAACC			524

Figura 20. Resultado del BLAST de G7: poliproteína de DENV-1. La coincidencia es total, no hay Gaps y la identidad es del 100%

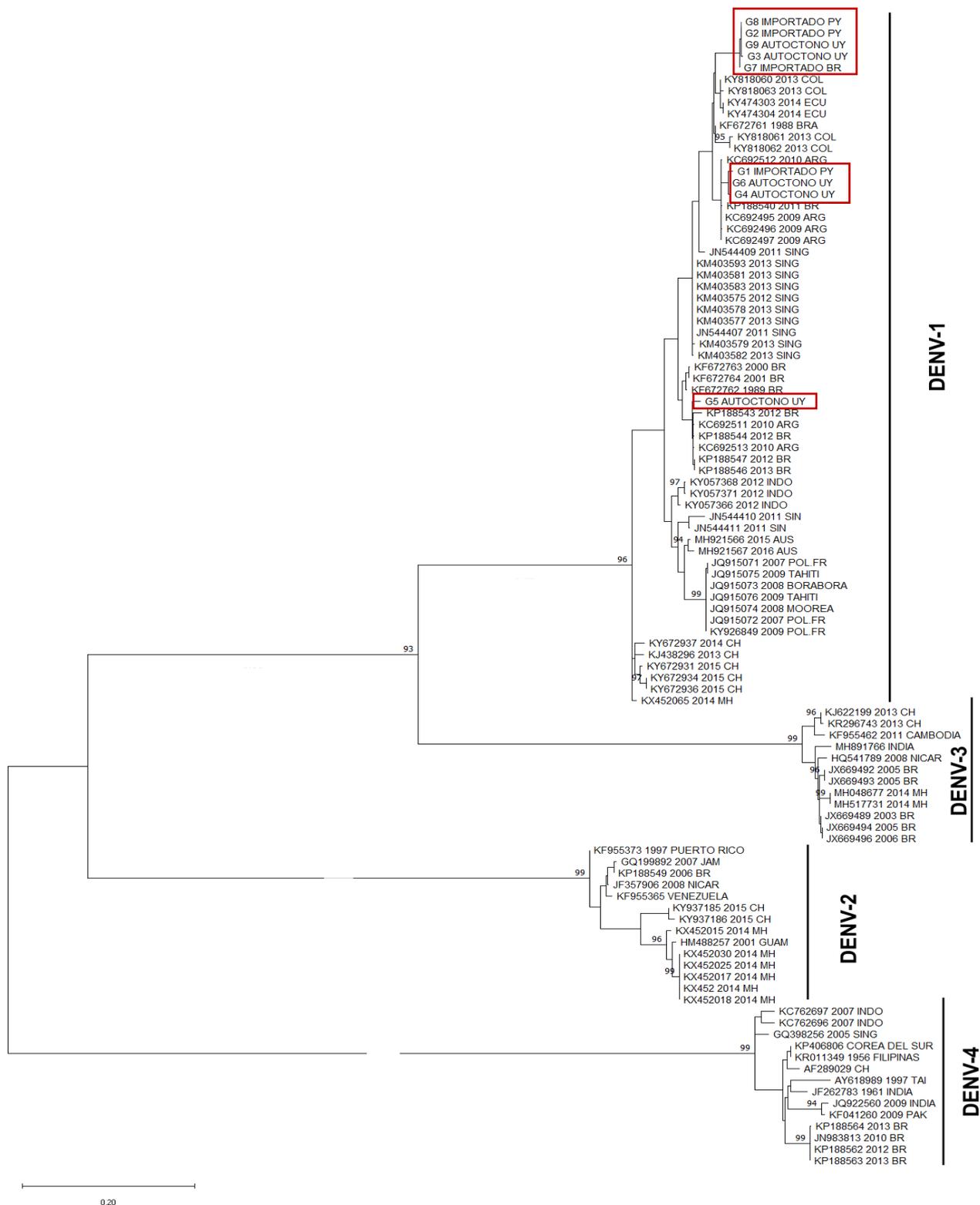


Figura 21. Árbol filogenético ML, con sustitución de nucleótidos TN93+G y bootstrap de 1000. El umbral de frecuencias en los nodos fue >90%. Las secuencias usadas para comparar se identifican con su número de acceso a GenBank, el año de recolección de la muestra y el país donde se extrajo la muestra. Las secuencias provenientes de los sueros del brote uruguayo 2016 se identifican de G1-G9, “autóctono uy” o “importado”. BR: Brasil, ARG: Argentina, INDO: Indonesia, COL: Colombia, ECU: Ecuador, PY: Paraguay, UY: Uruguay, AUS: Australia, SING: Singapur, CH: China, MH: Malasia, PAK: Pakistán, NICAR: Nicaragua.

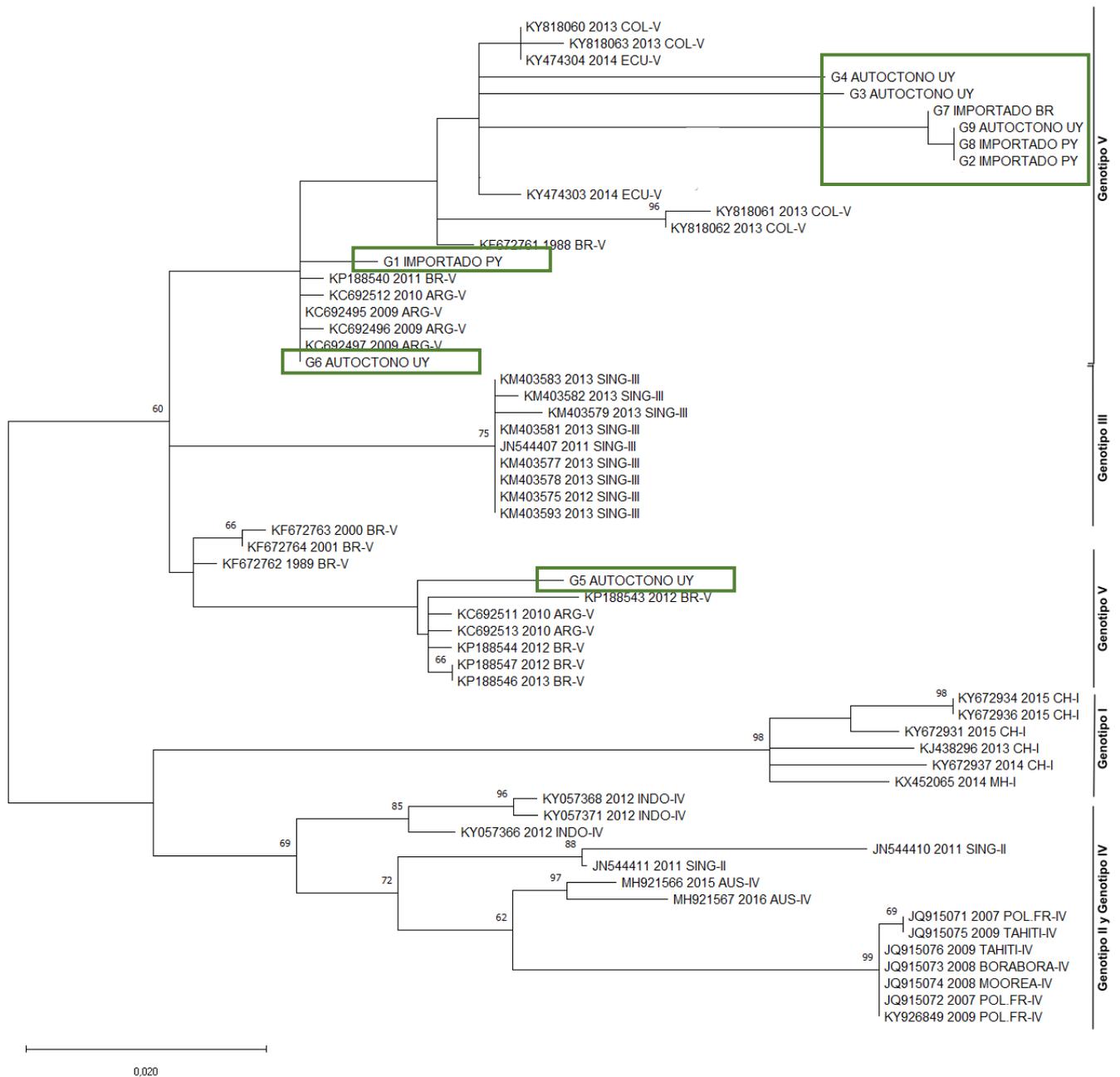


Figura 22. Árbol filogenético ML, con sustitución de nucleótidos K2P+G+I y bootstrap de 1000. El umbral de frecuencias en los nodos fue >60%. Las secuencias usadas para comparar se identifican con su número de acceso a GenBank, el año de recolección de la muestra y el país donde se extrajo la muestra. Las secuencias provenientes de los sueros del brote uruguayo 2016 se identifican de G1-G9, “autóctono uy” o “importado”. BR: Brasil, ARG: Argentina, INDO: Indonesia, COL: Colombia, ECU: Ecuador, PY: Paraguay, UY: Uruguay, AUS: Australia, SING: Singapur, CH: China, MH: Malasia, POL.FR: Polinesia Francesa.

DISCUSIÓN

Aislamiento viral en células C6/36

Según Singh 1969 y White 1987, las células C6/36 son altamente susceptibles a la infección con DENV. Estas células deberían presentar ECP de formaciones “tipo sincitiales” características con afectación de toda la monocapa en no más de 2 pasajes. Los sueros para inocular deberían estar diluidos al menos 1:10 para evitar lisis celular. En el presente trabajo, según la *tabla A-I Protocolo 20. Isolamento viral (Dengue) em células de inseto C6/36* se procesaron 10 muestras, con un total de 10 sueros con ECP claro y característico de DENV y con 9 muestras secuenciadas.

Se infectaron monocapas de C6/36 en dilución 1:40 aproximadamente (dependiendo del volumen de la muestra). El medio de cultivo elegido fue L15 con suero al 1.5% con agregado de triptosa y antibióticos. Existe también la posibilidad de trabajar en medio sin suero (Kuno, G. 1983), pero requeriría una adaptación de entre 3-6 semanas, además de que la tasa de crecimiento sería muy baja entre el tercer y octavo pasaje. Los resultados de las muestras de suero evidenciaron un buen ECP como en la *figura 9A* con sincitios, marcando el final de la infección. Situaciones similares reportaron Schatzmayr, H 1986 y Figueredo, L 1990.

En la literatura existen otras opciones para aislamiento: AP-61 de *Aedes pseudoscutellaris* y TRA-284-SF de *Toxorhynchites amboinensis*, ambas con buenas tasas de aislamiento, pero no tan efectivas para realizar inmunofluorescencia (Kuno, G 1985).

Detección de genoma viral mediante RT-PCR

De forma general, estos ensayos incluyen tres pasos: 1) extracción del ácido nucleico y su purificación, 2) amplificación y 3) detección y caracterización del producto amplificado. La extracción del ARN viral se hacía habitualmente por métodos de separación líquida, migrando hacia extracciones en fase sólida (productos comerciales) (WHO, 2009). En este trabajo se abordaron ambas metodologías con resultados comparables.

La elección de la metodología se basó en el desarrollo de Lanciotti, R 1992, que obtuvo primers consenso para los cuatro serotipos de DENV (también desarrolló primers específicos para cada serotipo realizando nested PCR, pero no es parte del objetivo del presente trabajo). Según este autor, la elección de ambos primers (D1 y D2), siguieron los criterios: 1) máxima homología entre los cuatro serotipos, 2) alta temperatura de fusión y 3) no homología con otras regiones de DENV.

En un 90% los amplicones se pudieron verificar mediante gel de agarosa. Algunos, como se muestra en la *figura 5 parte superior*, tuvieron resultados positivos en el primer intento (muestra 4725181 y 4721171). No así en los mostrados en la *figura 10 parte inferior*, que no revelaron resultados positivos (sueros 4729901 y 4730691). En casos como estos, existe una aparente contradicción entre el ECP observado al microscopio y la ausencia de banda específica para DENV. Por lo tanto, se decidió recurrir al stock viral volviendo a realizar las infecciones.

Un caso distinto es la muestra 4728861, que pasados 7 días de infección y al no presentar ECP, se decidió realizar un pasaje en ciego (sin saber la carga viral) hacia una monocapa fresca con no más de 24 horas de crecimiento. Como se observa en la *figura 6*, tanto en el primer pasaje como en el segundo se evidenció en la RT-PCR una banda específica para DENV.

El porcentaje de confirmaciones es elevado, siendo consistente con la literatura. Esto probablemente se deba a que las muestras del suero utilizadas para el aislamiento provienen de pacientes con dengue en fase febril, con síntomas y por ende con una carga viral alta.

Identificación de la infección mediante IFI en portaobjeto y en placa

Existe variedad de aproximaciones para la identificación de antígenos virales. Más allá de las diversas técnicas, lo primordial es ser capaz de detectarlos.

Según Peeling, R. 2010, la detección inmunohistoquímica de antígenos de origen viral se puede observar tanto en cultivos celulares como en tejidos, usando marcadores fluorescentes, enzimas u oro coloidal. Para ambos, las células se fijan y permeabilizan utilizando acetona. Se usa un anticuerpo anti-flavivirus E 4G2, un anticuerpo secundario anti-mouse ALEXA y tinción nuclear DAPI. Figueredo, L. 1990, utiliza láminas de microscopía a la que incorpora suspensión de células infectadas, las fija con acetona, incubando primero con anticuerpos con DENV y luego incubando con anticuerpos conjugados con FITC. Su procedimiento es similar al del presente trabajo realizado en portaobjeto. En tanto que Kuczera, D. 2016, permeabiliza células en placas de 24 pocillos con acetona:etanol 1:1, incubando con anti-flavivirus 4G2 y anticuerpo secundario ALEXA con tinción de núcleos DAPI. Una aproximación que utiliza parte de ambas metodologías se describe en Sucipto, T. H. 2016. Utiliza láminas con células Vero, fija con acetona y tiene como anticuerpo secundario ALEXA.

En el presente trabajo, se realizó primero una titulación de anticuerpos para determinar la concentración óptima de 4G2 y de ALEXA. La muestra 4721171 se eligió candidata por su buen ECP y banda en gel de agarosa. Los resultados se muestran en la *figura 15*, que permiten mostrar con claridad la presencia de proteínas de origen viral. A su vez, los controles negativos no presentan fluorescencia inespecífica. Sin embargo, si bien se observa positividad en las células infectadas, con frecuencia las imágenes no son de buena calidad, y no se observan claramente los límites de las células a causa de la formación de sincicios o deficiente disgregación del pellet al momento de preparar las láminas. Es por este motivo que se decide optimizar la inmunofluorescencia en placa M96. Dado que este método no implica desprendimiento mecánico de las células, se espera obtener mejores resultados respecto a la localización de las proteínas virales e individualización de las células C6/36 infectadas.

Los resultados de la IFI en placa de M96 se muestran en la *figura 17*. En la *figura 17.B*, en azul, se muestran los núcleos celulares con tinción DAPI, en rojo, el citoplasma celular teñido con azul de Evans. En la *figura 11.A*, en verde, la tinción debido al fluoróforo ALEXA. Con

esta variante de IFI se puede mostrar la ubicación precisa de material viral en el espacio intracelular, respecto a los controles negativos. Además, en la *figura 18* se realiza una titulación de 4G2 y ALEXA. Se obtuvo una IFI limpia, sin coloración de fondo, se observa claramente núcleos teñidos por el DAPI y en los pocillos infectados el citoplasma teñido por la presencia de la proteína E.

Caracterización genética mediante análisis filogenéticos

El DENV ha evolucionado desde ancestros selváticos hasta la actualidad donde circula ampliamente en ambientes urbanos y periurbanos, no dependiendo del ciclo selvático. Sin embargo, no está muy claro su origen. Mientras que autores sugieren un origen africano (Gaunt et al, 2001), otros estiman un origen asiático (Wang et al, 2000).

Existen cuatro serotipos bien distintos entre sí. De hecho, cada serotipo ha evolucionado independientemente, incluso al punto que autores lo consideran como “especies” de DENV distintas. Esta gran variación inter-serotípica, es gracias en parte a la tasa de mutación intrínsecamente alta de la ARN_{pol}. A su vez, existe variación intra-serotípica que identifica varios genotipos (Holmes, E.C, 2003 y Chen, R., 2011). Este gran avance fue confirmado en el estudio de Rico-Hesse (1990). La autora pudo reconocer “genotipos” a aquellos grupos de secuencias que tuvieran menos de 6% de divergencia entre ellos.

La clasificación serotípica de las secuencias DENV del presente trabajo se realizó mediante análisis filogenético. Recopilando secuencias de los cuatro serotipos de varias ubicaciones geográficas de todo el mundo (ver *tabla A-3* en Anexo), se construyó un árbol filogenético con el modelo de máxima verosimilitud, (*figura 21*). Los resultados muestran que todas las secuencias analizadas se ubican dentro de DENV-1 con un valor de bootstrap >90%. Además, el orden de ramificación de los cuatro serotipos es concordante con la literatura. El primero en divergir es DENV-4, luego DENV-2, DENV-3 y por último DENV-1 (Holmes, E.C, 2003).

Dentro de DENV-1, el análisis con secuencias parciales o totales del gen codificante para la proteína E, así como también el análisis del genoma completo identifica 5 genotipos. En el trabajo de Chen. R. 2011, se reafirman la cantidad de linajes a partir un árbol filogenético con 1812 secuencias de DENV-1. Es de suponer que las secuencias analizadas en este trabajo se identifiquen con el genotipo V americano.

El árbol filogenético de ML de la *figura 22* evidencia que todas las secuencias del brote uruguayo efectivamente pertenecen al genotipo V americano. La secuencia G5 (autóctona) se relaciona con secuencias aisladas en Argentina y Brasil. También, las secuencias G1 (importado de Py) y G6 (autóctono) se relacionan a secuencias aisladas en Argentina y Brasil, pero con un mayor grado de divergencia. Eso se aprecia en el árbol como dos grupos o clados bien diferenciados, apoyado por un nivel de bootstrap >60%. En tanto que las muestras G2 (importado de Py), G3 (autóctono), G4 (autóctono), G7 (importado de Br), G8 (importado de Py) y G9 (autóctono) se agrupan en un clado similar a secuencias aisladas en Colombia y Ecuador.

CONCLUSIONES

Se logro aislar 9 de 10 virus a partir de los sueros del brote 2016 empleados en este estudio. La metodología empleada fue eficaz, ya que solo una 1 muestra no pudo ser aislada.

Se lograron producir stocks virales infectando células C6/36, mediante la observación al microscopio de claros ECPs y confirmación posterior por RT-PCR y/o IFI.

Se puso a punto IFI en lámina y en placa con anticuerpo monoclonal, titulando y obteniendo las concentraciones del anticuerpo y su conjugado. De acuerdo a la calidad y practicidad de la IFI en placa, se considera en este trabajo como una mejor técnica para la identificación virales en células de cultivo.

Se obtuvo amplificación y secuencia de 9 muestras, logrando identificarlas como DENV-1 genotipo V. El análisis muestra además que, basándonos en las muestras que fueron analizadas en este trabajo, probablemente en el brote de DENV 2016 hubo al menos 3 introducciones independientes del virus.

REFERENCIAS

- 1) Anderson R. (2003). Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Advances in virus research*, 59, 229–274. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59007-8](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59007-8)
- 2) Bartenschlager, R., & Miller, S. (2008). Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future microbiology*, 3(2), 155–165. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.2.155>
- 3) Barth, O. M., & Schatzmayr, H. G. (1992). Brazilian dengue virus type 1 replication in mosquito cell cultures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87, 1-7.
- 4) Burgeño, A., Morel, N., Coppola, L., Ramas, V., Garland, M. L., Brasesco, M., Chiparelli, H (2016): Re-emergencia de la transmisión autóctona de virus Dengue en Uruguay. DLSP. MSP. XII Congreso Argentino de Virología (79)
- 5) Cafferata, M. L., Bardach, A., Rey-Ares, L., Alcaraz, A., Cormick, G., Gibbons, L., Romano, M., Cesaroni, S., & Ruvinsky, S. (2013). Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Value in health regional issues*, 2(3), 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2013.10.002>
- 6) Chen, R., & Vasilakis, N. (2011). Dengue—quo tu et quo vadis?. *Viruses*, 3(9), 1562-1608.
- 7) Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- 8) Cleaves, G. R., & Dubin, D. T. (1979). Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology*, 96(1), 159–165. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90181-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90181-8)
- 9) Cologna, R., Armstrong, P. M., & Rico-Hesse, R. (2005). Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *Journal of virology*, 79(2), 853–859. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.853-859.2005>
- 10) Figueiredo, L. (1990). Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 23(1), 13-18. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821990000100003>
- 11) Gaunt, M. W., Sall, A. A., de Lamballerie, X., Falconar, A. K., Dzhivanian, T. I., & Gould, E. A. (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*, 82(8), 1867-1876.
- 12) Gubler, D. J., Kuno, G., Sather, G. E., Velez, M., & Oliver, A. (1984). Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 33(1), 158–165. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.158>
- 13) Gubler D. J. (2001). Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951, 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>

- 14) Guzman, M. G., & Kouri, G. (2003). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 27(1), 1–13.
[https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(03\)00010-6](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(03)00010-6)
- 15) Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution*, 3(1), 19-28.
- 16) Hotta, S. (1952). Experimental studies on dengue: I. Isolation, identification and modification of the virus. *The Journal of infectious diseases*, 1-9.
- 17) Igarashi A. (1978). Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *The Journal of general virology*, 40(3), 531–544.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-40-3-531>
- 18) Información de ICTV, opción Taxonomy
- 19) Kuczera, D., Bavia, L., Mosimann, A. L., Koishi, A. C., Mazzarotto, G. A., Aoki, M. N., Mansano, A. M., Tomeleri, E. I., Costa Junior, W. L., Miranda, M. M., Lo Sarzi, M., Pavanelli, W. R., Conchon-Costa, I., Duarte Dos Santos, C. N., & Bordignon, J. (2016). Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. *Virology journal*, 13, 93.
<https://doi.org/10.1186/s12985-016-0548-9>
- 20) Kuno, G., Gubler, D. J., Vélez, M., & Oliver, A. (1985). Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(2), 279–286.
- 21) Kurane, I., & Ennis, F. E. (1992, April). Immunity and immunopathology in dengue virus infections. In *Seminars in immunology* (Vol. 4, No. 2, pp. 121-127).
- 22) Lambrechts, L., Fansiri, T., Pongsiri, A., Thaisomboonsuk, B., Klungthong, C., Richardson, J. H., Ponlawat, A., Jarman, R. G., & Scott, T. W. (2012). Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. *Journal of virology*, 86(3), 1853–1861. <https://doi.org/10.1128/JVI.06458-11>
- 23) Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(3), 545–551.
- 24) Lindoso, J. A., & Lindoso, A. A. (2009). Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(5), 247–253.
<https://doi.org/10.1590/s0036-46652009000500003>
- 25) Monath, T. P. (1994, April). Yellow fever and dengue—the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. In *Seminars in virology* (Vol. 5, No. 2, pp. 133-145). Academic Press.
- 26) Ministerio de Salud, Argentina: Enfermedades infecciosas: Dengue. Diagnostico. Guías para el equipo de salud. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. (2009) 55
- 27) OhAinle, M., Balmaseda, A., Macalalad, A. R., Tellez, Y., Zody, M. C., Saborío, S., Nuñez, A., Lennon, N. J., Birren, B. W., Gordon, A., Henn, M. R., & Harris, E. (2011). Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Science translational medicine*, 3(114), 114ra128.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003084>

- 28) Organización Mundial de la Salud. Asamblea Mundial sobre Salud. Resolución 46.31. Ginebra. WHO (1993)
- 29) Organización Panamericana de la Salud: Dengue: Información general. Web: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493:2010-informacion-general-dengue&Itemid=40232
- 30) Patel, P., Landt, O., Kaiser, M., Faye, O., Koppe, T., Lass, U., ... & Niedrig, M. (2013). Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology journal*, 10(1), 1-11.
- 31) Peeling, R., Artsob, H., Pelegrino, J. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol* 8, S30–S37 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
- 32) Platt, K. B., Linthicum, K. J., Myint, K. S., Innis, B. L., Lerdthusnee, K., & Vaughn, D. W. (1997). Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57(2), 119–125. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.119>
- 33) Racloz, V., Ramsey, R., Tong, S., & Hu, W. (2012). Surveillance of dengue fever virus: a review of epidemiological models and early warning systems. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5), e1648. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001648>
- 34) Repik, P. M., Dalrymple, J. M., Brandt, W. E., McCown, J. M., & Russell, P. K. (1983). RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *ARMY MEDICAL RESEARCH INST OF INFECTIOUS DISEASES FORT DETRICK MD*.
- 35) Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174(2), 479-493.
- 36) Rosen, L. (1977). The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 26(3), 337-343.
- 37) Sabin, A. B. (1952). Research on dengue during World War II. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1(1), 30-50.
- 38) Schatzmayr, H. G., Nogueira, R. M. R., & Rosa, A. P. D. A. T. D. (1986). An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986.
- 39) Singh, K. R., & Paul, S. D. (1969). Isolation of Dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. *Bulletin of the World Health Organization*, 40(6), 982–983.
- 40) St John, A. L., & Rathore, A. (2019). Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. *Nature reviews. Immunology*, 19(4), 218–230. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0123-x>
- 41) Stoddard, S. T., Forshey, B. M., Morrison, A. C., Paz-Soldan, V. A., Vazquez-Prokopec, G. M., Astete, H., Reiner, R. C., Jr, Vilcarrromero, S., Elder, J. P., Halsey, E. S., Kochel, T. J., Kitron, U., & Scott, T. W. (2013). House-to-house human movement drives dengue virus transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), 994–999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213349110>
- 42) Sucipto, T. H., Ahwanah, N. L. F., Churrotin, S., Matake, N., Kotaki, T., & Soegijanto, S. (2016, March). Immunofluorescence assay method to detect dengue virus in Paniai-Papua. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1718, No. 1, p. 040001). AIP Publishing LLC.

- 43) Suitor, E. C., Jr, & Paul, F. J. (1969). Syncytia formation of mosquito cell cultures mediated by type 2 dengue virus. *Virology*, 38(3), 482–485.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90162-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90162-7)
- 44) Tarasuk, M., Songprakhon, P., Chamma, P., Sratongno, P., Na-Bangchang, K., & Yenchitsomanus, P. T. (2017). Alpha-mangostin inhibits both dengue virus production and cytokine/chemokine expression. *Virus research*, 240, 180–189.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.011>
- 45) Teixeira, M. G., Costa, M. C., Coelho, G., & Barreto, M. L. (2008). Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 14(10), 1663. <https://doi.org/10.3201/eid1410.071164>
- 46) Uno, N., & Ross, T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 167. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0168-0>
- 47) Vu, T. T., Holmes, E. C., Duong, V., Nguyen, T. Q., Tran, T. H., Quail, M., Churcher, C., Parkhill, J., Cardoso, J., Farrar, J., Wills, B., Lennon, N. J., Birren, B. W., Buchy, P., Henn, M. R., & Simmons, C. P. (2010). Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(7), e757.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000757>
- 48) Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D., Watowich, S. J., Gubler, D. J., & Weaver, S. C. (2000). Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of virology*, 74(7), 3227-3234.
- 49) Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution*, 9(4), 523-540.
- 50) White L. A. (1987). Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection. *Journal of clinical microbiology*, 25(7), 1221–1224.
- 51) WHO/TDR: Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. (2009) New Edition. Geneva, World Health Organization

ANEXO

A-1. Protocolo 20: aislamiento viral (Dengue) en células de insecto C6/36 – ViroMol Laboratório de Virologia Molecular ICC/Fiocruz – Modificado y traducido

- Preparar una botella de 25 cm³ con 2x10⁶ células C6/36 en medio L15 suplementado con 25µg/mL de gentamicina, 5% de SFB y 0,26% de triptosa.
- Preparar siempre una botella más que el número de muestras que va a ser aisladas para uso como control negativo (para control negativo usamos el medio L15 conteniendo 25µg/mL de gentamicina, 5% de SFB y 0,26% de triptosa filtrado con membrana de 0,22µm).
- Luego de 24 horas de crecimiento de las células infectar con 500µL de suero humano diluido 1:10 (*los volúmenes de dilución son modificados de acuerdo al volumen real de suero humano*) no inactivado y filtrado usando membrana de 0,22µm.
- Incubar hasta por 1 hora y 30 minutos (homogeneizando cada 15 minutos) a 27°C recuperar el inóculo utilizando pipeta Pasteur estéril en un tubo Falcon de 15mL con 5mL de medio con suero, centrifugar 5 minutos a aproximadamente 3500 rpm (apenas para bajar las células). Descartar el sobrenadante y recuperar el pellet de células (no siempre es posible verlo) en 5mL de medio L15 conteniendo 25µg/mL de gentamicina, 5% de SFB y 0,26% de triptosa (*se modifica quitando la triptosa en este paso*) y adicionar en la misma botella que se hizo el aislamiento.
- Incubar las botellas hasta por 15 días a 27°C en medio sin intercambio de CO₂. A lo largo de la infección chequear si aparece ECP y con 7-10 días chequear su positividad por inmunofluorescencia indirecta (*esta parte no se realiza en el presente trabajo*).

Tabla A-2. Volumes of Buffer AVL and carrier RNA-Buffer mix required for the QIAamp Viral RNA Mini procedure

No. Samples	Vol. Buffer AVL (mL)	Vol. carrier RNA-AVE (µL)	No. Samples	Vol. Buffer AVL (mL)	Vol. carrier RNA-AVE (µL)
1	0,56	5,6	13	7,28	72,8
2	1,12	11,2	14	7,84	78,4
3	1,68	16,8	15	8,40	84,0
4	2,24	22,4	16	8,96	89,6
5	2,80	28,0	17	9,52	95,2
6	3,36	33,6	18	10,08	100,8
7	3,92	39,2	19	10,61	106,4
8	4,48	44,8	20	11,20	112,0
9	5,04	50,4	21	11,76	117,6
10	5,60	56,0	22	12,32	123,2
11	6,16	61,6	23	12,88	128,8
12	6,72	67,2	24	13,44	134,4

Extraída de "QIAamp Viral RNA Mini Handbook 04/2010"

Tabla A-3. Secuencias utilizadas para construir árboles filogenéticos

Secuencia	Número de acceso Genbank	Fecha recolección de muestra	País de recolección de muestra	Serotipo	Genotipo
G1 IMPORTADO PY	-	2016	Uruguay	1	5
G2 IMPORTADO PY	-	2016	Uruguay	1	5
G3 AUTÓCTONO UY	-	2016	Uruguay	1	5
G4 AUTÓCTONO UY	-	2016	Uruguay	1	5
G5 AUTÓCTONO UY	-	2016	Uruguay	1	5
G6 AUTÓCTONO UY	-	2016	Uruguay	1	5
G7 IMPORTADO BR	-	2016	Uruguay	1	5
G8 IMPORTADO PY	-	2016	Uruguay	1	5
G9 AUTÓCTONO UY	-	2016	Uruguay	1	5
KY818060 2013 COL	KY818060	2013	Colombia	1	5
KY818063 2013 COL	KY818063	2013	Colombia	1	5
KY474303 2014 ECU	KY474303	2014	Machala-Ecuador	1	5
KY474304 2014 ECU	KY474304	2014	Machala-Ecuador	1	5
KF672761 1988 BRA	KF672761	1988	Rio de Janeiro, Brasil	1	5
KY818061 2013 COL	KY818061	2013	Colombia	1	5
KY818062 2013 COL	KY818062	2013	Colombia	1	5
KC692512 2010 ARG	KC692512	17/02/10	Buenos Aires-Argentina	1	5
KP188540 2011 BR	KP188540	03/05/11	Brasil	1	5
KC692495 2009 ARG	KC692495	03/02/09	Buenos Aires-Argentina	1	5
KC692496 2009 ARG	KC692496	19/2/09	Buenos Aires-Argentina	1	5
KC692497 2009 ARG	KC692497	2/3/09	Buenos Aires-Argentina	1	5
JN544409 2011 SING	JN544409	2011	Singapur	1	3
KM403593 2013 SING	KM403593	2013	Singapur	1	3
KM403581 2013 SING	KM403581	2013	Singapur	1	3
KM403583 2013 SING	KM403583	2013	Singapur	1	3
KM403575 2012 SING	KM403575	2012	Singapur	1	3
KM403578 2013 SING	KM403578	2013	Singapur	1	3
KM403577 2013 SING	KM403577	2013	Singapur	1	3
JN544407 2011 SING	JN544407	04/11	Singapur	1	3
KM403579 2013 SING	KM403579	2013	Singapur	1	3
KM403582 2013 SING	KM403582	2013	Singapur	1	3
KF672763 2000 BR	KF672763	2000	Brasil	1	5
KF672764 2001 BR	KF672764	2001	Rio de Janeiro, Brasil	1	5
KF672762 1989 BR	KF672762	1989	Rio de Janeiro, Brasil	1	5
KP188543 2012 BR	KP188543	13/2/12	Brasil	1	5
KC692511 2010 ARG	KC692511	10/2/10	Buenos Aires-Argentina	1	5
KP188544 2012 BR	KP188544	16/3/12	San Pablo, Brasil	1	5
KC692513 2010 ARG	KC692513	26/4/10	Buenos Aires-Argentina	1	5
KP188547 2012 BR	KP188547	5/1/13	San Pablo, Brasil	1	5
KP188546 2013 BR	KP188546	4/2/13	Brasil	1	5
KY057368 2012 INDO	KY057368	2012	Surabaya, Indonesia	1	4
KY057371 2012 INDO	KY057371	2012	Surabaya, Indonesia	1	4
KY057366 2012 INDO	KY057366	2012	Surabaya, Indonesia	1	4
JN544410 2011 SIN	JN544410	04/11	Singapur	1	2
JN544411 2011 SIN	JN544411	01/11	Singapur	1	2
MH921566 2015 AUS	MH921566	2015	Queensland, Australia	1	4
MH921567 2016 AUS	MH921567	2016	Queensland, Australia	1	4
JQ915071 2007 POL.FR	JQ915071	23/5/07	Raiatea, Polinesia Francesa	1	4
JQ915075 2009 TAHITI	JQ915075	6/2/09	Tahiti, Polinesia Francesa	1	4
JQ915073 2008 BORABORA	JQ915073	7/3/08	Bora Bora, Polinesia Francesa	1	4

JQ915076 2009 TAHITI	JQ915076	9/6/09	Tahiti, Polinesia Francesa	1	4
JQ915074 2008 MOOREA	JQ915074	18/9/08	Moorea, Polinesia Francesa	1	4
JQ915072 2007 POL.FR	JQ915072	5/11/07	Tubuai, Polinesia Francesa	1	4
KY926849 2009 POL.FR	KY926849	8/1/08	Polinesia Francesa	1	4
KY672937 2014 CH	KY672937	1/8/14	Yunnan, China	1	1

Secuencia	Número de acceso Genbank	Fecha recolección de muestra	País de recolección de muestra	Serotipo	Genotipo
KY672931 2015 CH	KY672931	9/1/15	Yunnan, China	1	1
KY672934 2015 CH	KY672934	22/10/15	Yunnan, China	1	1
KY672936 2015 CH	KY672936	6/7/15	Yunnan, China	1	1
KX452065 2014 MH	KX452065	01/14	Johor Bahru, Malasia	1	1
KJ622199 2013 CH	KJ622199	2013	China	3	-
KR296743 2013 CH	KR296743	2013	China	3	-
KF955462 2011 CAMBODIA	KF955462	2001	Cambodia	3	-
MH891766 INDIA	MH891766	21/2/17	Nilgiri, India	3	-
HQ541789 2008 NICAR	HQ541789	2008	Managua, Nicaragua	3	-
JX669492 2005 BR	JX669492	2005	Pernambuco, Brasil	3	-
JX669493 2005 BR	JX669493	2005	Pernambuco, Brasil	3	-
MH048677 2014 MH	MH048677	12/14	Malasia	3	3
JX669489 2003 BR	JX669489	2003	Pernambuco, Brasil	3	-
JX669494 2005 BR	JX669494	2005	Pernambuco, Brasil	3	-
JX669496 2006 BR	JX669496	2006	Pernambuco, Brasil	3	-
KF955373 1997 PUERTO RICO	KF955373	1997	Puerto Rico	2	-
GQ199892 2007 JAM	GQ199892	2007	Jamaica	2	-
KP188549 2006 BR	KP188549	26/5/06	Brasil	2	-
JF357906 2008 NICAR	JF357906	2008	Managua, Nicaragua	2	-
KF955365 VENEZUELA	KF955365	-	Venezuela	2	-
KY937185 2015 CH	KY937185	2015	XiShuangbanna	2	-
KY937186 2015 CH	KY937186	2015	XiShuangbanna	2	-
KX452015 2014 MH	KX452015	01/14	Johor Bahru, Malasia	2	Cosmopolita
HM488257 2001 GUAM	HM488257	2001	Guam	2	-
KX452030 2014 MH	KX452030	01/14	Johor Bahru, Malasia	2	Cosmopolita
KX452025 2014 MH	KX452025	01/14	Johor Bahru, Malasia	2	Cosmopolita
KX452017 2014 MH	KX452017	01/14	Johor Bahru, Malasia	2	Cosmopolita
KX452016 2014 MH	KX452016	01/14	Johor Bahru, Malasia	2	Cosmopolita
KX452018 2014 MH	KX452018	01/14	Johor Bahru, Malasia	2	Cosmopolita
KC762697 2007 INDO	KC762697	11/12/07	Makassar, Indonesia	4	-
KC762696 2007 INDO	KC762696	11/12/07	Makassar, Indonesia	4	-
GQ398256 2005 SING	GQ398256	2005	Singapur	4	-
KP406806 COREA DEL SUR	KP406806	-	Corea del Sur	4	-
KR011349 1956 FILIPINAS	KR011349	28/8/56	Filipinas	4	-
AF289029 CH	AF289029	-	Guangzhou, China	4	-
AY618989 1997 TAI	AY618989	1997	Bankok, Tailandia	4	-
JF262783 1961 INDIA	JF262783	1961	India	4	-
JQ922560 2009 INDIA	JQ922560	2009	Pune, India	4	-
KF041260 2009 PAK	KF041260	2009	Karachi, Pakistan	4	1
KP188564 2013 BR	KP188564	10/1/13	Brasil	4	2
JN983813 2010 BR	JN983813	8/9/10	Boa Vista, Brasil	4	2
KP188562 2012 BR	KP188562	10/12/12	Brasil	4	2
KP188563 2013 BR	KP188563	7/1/12	Brasil	4	2

